

**ETUDE DE LA TOXICITE HEPATIQUE DE LA COCAINE ASSOCIEE A DE
L'ALCOOL**

EFFETS DE L'ETHANOL SUR LE METABOLISME DE LA COCAINE DANS LES
HEPATOCYTES DE RAT EN SUSPENSION ET DANS UN MODELE ENZYMATIQUE
HUMAIN

**THESE DE DOCTORAT EN CO-TUTELLE AVEC L'UNIVERSITE JOSEPH
FOURIER - GRENOBLE I**

Présentée à la

Faculté de Pharmacie de l'Université Joseph Fourier - Grenoble I

Par

Karine BERTHOIN

Diplômée d'Etudes Approfondies de Toxicologie

Université Claude Bernard - Lyon I

Jury

Professeur Jean-Luc VEUTHEY, Président

Professeur Pierre HAINARD, Rapporteur

Professeur Luc BARRET, Directeur de thèse

Professeur Patrice MANGIN, Directeur de thèse

Docteur Odile SERGENT, Rapporteur

Docteur Christian GIROUD, Rapporteur

Professeur Germain BESSARD, Examineur

Grenoble

2000

A mes parents, avec toute ma gratitude

S'efforcer de se convaincre soi-même de la vérité qu'on a entrevue est le premier pas vers le progrès ; persuader les autres est le second. Il en est un troisième, peut-être moins utile, mais fort enviable néanmoins, qui est de convaincre ses adversaires.

Louis Pasteur (1822-1895)

L'essentiel de ma gratitude va vers les Professeurs Luc Barret et Patrice Mangin, tous deux directeurs de cette thèse, qui ont guidé mon orientation.

Je remercie très sincèrement le Professeur Germain Bessard, examinateur, qui m'a offert les meilleures conditions pour effectuer les expérimentations.

Que le Professeur Pierre Hainard, rapporteur nommé par la Faculté des Sciences de l'Université de Lausanne, soit également remercié.

J'adresse aux Docteurs Odile Sergent et Christian Giroud mes très vifs remerciements pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.

Je remercie également le Professeur Jean-Luc Veuthey d'avoir bien voulu présider cette thèse.

Je tiens à remercier également le Professeur François Widmer pour ses nombreux conseils.

Je souhaite exprimer toute ma gratitude à chaque membre des laboratoires de Médecine Légale et Pharmacologie de Grenoble ainsi qu'au personnel des Instituts Universitaires de Médecine Légale et de Physiologie des Plantes de Lausanne.

Je remercie enfin la Région Rhône-Alpes ainsi que la Fondation pour la Recherche Médicale pour les bourses doctorales qu'elles m'ont octroyée.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE	1
-----------------------------	---

TRAVAUX ANTERIEURS

CHAPITRE I. LA COCAINE

I. GENERALITES	3
II. PHARMACOLOGIE	3
III. METABOLISME, PHARMACOCINETIQUE ET PHARMACODY- NAMIE	4
IV. TOXICITE	7
IV.1. NECROSE HEPATIQUE	9
IV.2. STRESS OXYDATIF	10
IV.2.1. PRODUCTION D'ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE	10
IV.2.2. DEFICIENCE DES SYSTEMES DE DEFENSE DE LA CELLULE	11
IV.3. HEPATOTOXICITE REVERSIBLE ET MECANISME DE DEFENSE	14

CHAPITRE II. COCAINE ET ALCOOL, UN COCKTAIL EXPLOSIF

I. GENERALITES	16
II. HISTORIQUE	16
III. EPIDEMIOLOGIE	18
IV. PHARMACOLOGIE	18
V. METABOLISME	19
VI. INTERACTIONS COCAINE ET ALCOOL : EFFETS SUR LA PHARMACOCINETIQUE ET LA PHARMACODYNAMIE DE LA COCAINE	20
VII. TOXICITE	20

CHAPITRE III. LE FOIE

I. INTRODUCTION	23
II. METABOLISME DES XENOBIOTIQUES PAR LES HEPATOCYTES ISOLEES	24
III. UTILISATION DES HEPATOCYTES ISOLEES POUR DES ETUDES DE TOXICITE	26
IV. UTILISATION D'UN MODELE ACELLULAIRE POUR DES ETUDES DE TOXICITE	27
V. INTERETS DES MODELES HEPATIQUES CHOISIS	27

PARTIE EXPERIMENTALE

OBJECTIFS DE NOTRE TRAVAIL	29
----------------------------------	----

PARTIE I : ETUDE DES INTERACTIONS COCAINE-ETHANOL SUR UN MODELE CELLULAIRE CONSTITUE D'UNE SUSPENSION D'HEPATOCYTES ISOLES DE RAT

CHAPITRE IV. CHOIX ET MISE AU POINT DE LA METHODE D'EXTRACTION / DERIVATISATION DE LA COCAINE, DU COCAETHYLENE ET DE HUIT DE LEURS METABOLITES RESPECTIFS

I. PRODUITS ET MATERIEL	32
I.1. PRODUITS CHIMIQUES	32
I.1.1. COMPOSES D'INTERET	33
I.1.2. AUTRES PRODUITS ET SOLUTIONS	33
I.2. MATERIEL	34
II. DEFINITION DU MODE D'EXTRACTION	34
III. SELECTION DE LA PHASE ADSORBANTE	36
IV. OPTIMISATION DES CONDITIONS D'EXTRACTION SUR LA PHASE ADSORBANTE C8-SCX	39
IV.1. CHOIX DU pH DE L'ECHANTILLON	39
IV.2. CHOIX DES SOLVANTS DE LAVAGE	41
IV.3. CHOIX DES SOLVANTS D'ELUTION	42
V. CHOIX DE L'AGENT DE DERIVATISATION	43
VI. CONCLUSION	44

CHAPITRE V. CHOIX ET MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE ANALYTIQUE PAR CHROMATOGRAPHIE PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE

I. NOTION THEORIQUE ET APPAREILLAGE	46
I.1. PRINCIPE PHYSIQUE	47
I.2. DIFFERENTES FONCTIONS	47
I.2.1. LA SOURCE D'IONS OU CHAMBRE D'IONISATION	47
I.2.2. L'ANALYSEUR : SEPARATION ET DISPERSION DES MASSES	48
I.2.3. LE DETECTEUR	48
I.2.4. L'INTERFACE	48
II. MODE D'INTRODUCTION ET ANALYSES	49
II.1. COUPLAGE CHROMATOGRAPHIE GAZ-LIQUIDE / SPECTRO- METRIE DE MASSE	49
II.2. ACQUISITION DES DONNEES	49
II.2.1. CHROMATOGRAMME DU COURANT IONIQUE TOTAL	49
II.2.2. FRAGMENTOMETRIE	50
II.2.2.1. ETUDE DES SPECTRES DE MASSE	50
II.2.2.2. REPRESENTATION GRAPHIQUE DES SPECTRES DE MASSE	51
II.3. PARAMETRES D'IDENTIFICATION ET DE QUANTIFICATION	59
II.4. RESUME DES CONDITIONS OPERATOIRES EN CHROMATOGRAPHIE PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE	60
III. TEST AVEC LE MELANGE REACTIONNEL	61
IV. CONCLUSION	62

CHAPITRE VI. VALIDATION DE LA TECHNIQUE ANALYTIQUE PAR CHROMATOGRAPHIE PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE

I. PROCEDURE DE VALIDATION	64
I.1. LINEARITE	64
I.1.1. PROCEDURE	65
I.1.2. RESULTATS	65
I.2. LIMITES DE LINEARITE	66
I.2.1. PROCEDURE	67
I.2.2. RESULTATS	67
I.3. PRECISION : PROCEDURE ET RESULTATS	67
I.4. RENDEMENTS D'EXTRACTION	69
II. CONCLUSION	70

CHAPITRE VII. INTERACTIONS COCAINE ET ALCOOL CHEZ LE RAT: EFFETS SUR LA PHARMACOCINETIQUE DE LA COCAINE

I. MATERIELS	72
I.1. PRODUITS CHIMIQUES	72
I.1.1. COMPOSES D'INTERET	72
I.1.2. AUTRES PRODUITS ET SOLUTIONS	73
I.2. ANIMAUX	74
II. ETUDE DES EFFETS DE L'ETHANOL SUR SUSPENSIONS D'HEPATOCYTES DE RAT SUPPLEMENTES EN COCAINE	74
II.1. CHOIX DES CONDITIONS EXPERIMENTALES	74
II.1.1. PRODUITS A TESTER	74

II.1.2. CONDITIONS D'INCUBATION	75
II.1.2.1. MATERIEL D'INCUBATION	75
II.1.2.2. MILIEUX D'INCUBATION	75
II.1.2.3. DUREE DU TRAITEMENT	75
II.2. OBTENTION D'UNE SUSPENSION D'HEPATOCYTES	76
II.2.1. ISOLEMENT DES HEPATOCYTES DE RAT	76
II.2.2. MISE EN SUSPENSION	77
II.3. ETUDE PRELIMINAIRE : VERIFICATION DE LA VIABILITE DES CELLULES	77
II.4. INTOXICATION AIGUE D'UNE SUSPENSION D'HEPATOCY- TES	78
III. DOSAGES	79
III. 1. DOSAGE DE LA COCAINE ET DE SES METABOLITES RESPECTIFS PAR CHROMATOGRAPHIE PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE	79
III.1.1. METHODE D'EXTRACTION / DERIVATISATION	79
III.1.2. CHROMATOGRAPHIE PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE	80
III. 2. DOSAGE DE L'ETHANOL PAR ANALYSE DE L'ESPACE DE TETE PAR CHROMATOGRAPHIE PHASE GAZEUSE COUPLEE A UNE DETECTION PAR IONISATION DE FLAMME	80
IV. ANALYSES STATISTIQUES	80
V. RESULTATS	81
V.1. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION D'ETHANOL SUR LA CONCENTRATION DE COCAINE DANS LE MILIEU D'INCUBATION	81

V.2. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION D'ETHANOL SUR LA PRODUCTION DE BENZOYLECGONINE DANS LE MILIEU D'INCUBATION	82
V.3. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION D'ETHANOL SUR LA PRODUCTION D'ECGONINE METHYL ESTER DANS LE MILIEU D'INCUBATION	84
V.4. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION D'ETHANOL SUR LA PRODUCTION D'ECGONINE DANS LE MILIEU D'INCUBATION	86
V.5. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION D'ETHANOL SUR LA PRODUCTION DE NORCOCAINE DANS LE MILIEU D'INCUBATION	87
V.6. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION D'ETHANOL SUR LA PRODUCTION DE COCAETHYLENE DANS LE MILIEU D'INCUBATION	88
VI. CONCLUSION	90

DISCUSSION GENERALE	92
---------------------------	----

PARTIE II : ETUDE DES INTERACTIONS COCAINE-ETHANOL SUR UN MODELE ENZYMATIQUE FORTEMENT PURIFIE OBTENU A PARTIR D'UN FOIE HUMAIN

CHAPITRE I. MATERIELS ET METHODES

I. MATERIELS	94
I.1. PRODUITS CHIMIQUES	94
I.1.1. COMPOSES D'INTERET	94
I.1.2. AUTRES PRODUITS ET SOLUTIONS	95
I.2. MATERIEL	96
I.3. PREPARATION DE LA COLONNE D’AFFINITE	97
II. METHODES	97
II.1. CHOIX DES CONDITIONS EXPERIMENTALES	97
II.1.1. PRODUITS A TESTER	97
II.1.2. CONDITIONS D’INCUBATION	98
II.1.2.1. MATERIEL D’INCUBATION	98
II.1.2.2. MILIEUX D’INCUBATION	98
II.1.2.3. DUREE DE L’INCUBATION	98
II.2. PREPARATION D’UN SURNAGEANT HEPATIQUE HUMAIN	98
II.2.1. TISSU HUMAIN	98
II.2.2. PREPARATION D’UN EXTRAIT BRUT DE FOIE HUMAIN	99
II.2.3. CENTRIFUGATION	99
II.3. PROCEDURE DE PURIFICATION DES CARBOXYLESTERASES DE FOIE HUMAIN	99
II.4. TECHNIQUES ANALYTIQUES	101
II.4.1. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE EN PHASE INVERSE COUPLEE A UNE DETECTION PAR BARRETTES DE DIODE	101
II.4.2. ANALYSE DE L’ESPACE DE TETE PAR CHROMATOGRAPHIE PHASE GAZEUSE COUPLEE A UNE DETECTION PAR IONISATION DE FLAMME	108
II.4.2.1. GAMMES D’ETALONNAGE	110
II.4.2.2. DOSAGE DES ECHANTILLONS	112
II.4.2.3. APPLICATION D’UN FACTEUR DE CORRECTION	112
II.5. DETERMINATIONS DES ACTIVITES ENZYMATIQUES ET CHIMIQUES	112

II.5.1. ACTIVITES COCAINE METHYL ET BENZOYL ESTERASE	112
II.5.2. HYDROLYSE CHIMIQUE	113
III. ANALYSES STATISTIQUES	113

CHAPITRE II. RESULTATS

I. RESULTATS	114
I.1. HYDROLYSE CHIMIQUE	114
I.2. ACTIVITES COCAINE METHYL ET BENZOYL ESTERASE	115
I.2.1. CARACTERISATION DES ACTIVITES COCAINE METHYL ET BENZOYL ESTERASE DANS LE SURNAGEANT HEPATIQUE HUMAIN. EFFETS D'UN INHIBITEUR POTENTIEL, L'ETHANOL	115
I.2.2. ACTIVITES COCAINE METHYL ET BENZOYL ESTERASE DES CARBOXYLESTERASES PARTIELLEMENT OU FORTEMENT PURIFIEES (ETAPES I, II ET III). EFFETS D'UN INHIBITEUR POTENTIEL, L'ETHANOL	118
I.2.2.1. ACTIVITES COCAINE METHYL ET BENZOYL ESTERASE DES CARBOXYLESTERASES PARTIELLEMENT PURIFIEES APRES CHROMATOGRAPHIE PAR ECHANGE D'ANIONS (ETAPE I). EFFETS D'UN INHIBITEUR POTENTIEL, L'ETHANOL	118
I.2.2.2. ACTIVITES COCAINE METHYL ET BENZOYL ESTERASE DES CARBOXYLESTERASES PARTIELLEMENT PURIFIEES APRES CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE (ETAPE II)	122
I.2.2.3. ACTIVITES COCAINE METHYL ET BENZOYL ESTERASE DES CARBOXYLESTERASES FORTEMENT PURIFIEES APRES CHROMATOGRAPHIE PAR FILTRATION SUR GEL (ETAPE III). EFFETS D'UN INHIBITEUR POTENTIEL, L'ETHANOL	123
II. DISCUSSION	126

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION	129
---	-----

PERSPECTIVES	131
--------------------	-----

BIBLIOGRAPHIE	132
---------------------	-----

ANNEXES

ANNEXE I	149
----------------	-----

ANNEXE II	152
-----------------	-----

ANNEXE III	154
------------------	-----

ANNEXE IV	163
-----------------	-----

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

FIGURES

Figure 1. Voies métaboliques de la cocaïne.

Figure 2. Métabolisme oxydatif de la cocaïne.

Figure 3. Voies métaboliques de la cocaïne en présence d'éthanol.

Figure 4. Métabolisme oxydatif du cocaéthylène.

Figure 5. Schéma d'une cartouche d'extraction phase solide C8-SCX.

Figure 6. Schématisation de la méthode d'extraction phase solide.

Figure 7. Spectres de masse de la cocaïne, du cocaéthylène et de leurs métabolites respectifs silylés obtenus par CPG / SM.

Figure 8. Profil chromatographique reconstitué obtenu par CPG / SM à partir d'un échantillon de tampon Krebs-Henseleit-bicarbonate de sodium pH 7,4 surchargé en molécules d'intérêt et étalons deutérés.

Figure 9. Etude de la viabilité des hépatocytes de rat en suspension par le test au MTT.

Figure 10. Dégradation de la cocaïne en présence d'hépatocytes isolés de rat en l'absence ou en présence d'éthanol.

Figure 11. Formation de benzoylecgonine sur hépatocytes isolés de rat exposés à de la cocaïne en l'absence ou en présence d'éthanol.

Figure 12. Formation d'ecgonine méthyl ester sur hépatocytes isolés de rat exposés à de la cocaïne en l'absence ou en présence d'éthanol.

Figure 13. Formation d'ecgonine sur hépatocytes isolés de rat exposés à de la cocaïne en l'absence ou en présence d'éthanol.

Figure 14. Formation de norcocaïne sur hépatocytes isolés de rat exposés à de la cocaïne en l'absence ou en présence d'éthanol.

Figure 15. Formation de cocaéthylène sur hépatocytes isolés de rat exposés à de la cocaïne en présence d'éthanol.

Figure 16. Schéma de micropurification des carboxylesterases de foie humain.

Figure 17. Analyse simultanée de la cocaïne, du cocaéthylène, de la benzoylecgonine et de l'acide benzoïque par CLHP / DBD.

Figure 18. Spectres UV de la cocaïne, du cocaéthylène, de la benzoylecgonine, de l'acide benzoïque et de la lidocaïne par CLHP / DBD.

Figure 19. Courbes de calibration de la cocaïne, du cocaéthylène, de la benzoylecgonine et de l'acide benzoïque.

Figure 20. Chromatogrammes de l'éthanol obtenus par analyse de l'espace de tête par CPG / DIF selon deux méthodes.

Figure 21. Courbes de calibration de l'éthanol obtenues par analyse de l'espace de tête par CPG / DIF selon deux méthodes.

Figure 22. Hydrolyse chimique de la cocaïne seule ou en présence d'éthanol.

Figure 23. Effets de l'éthanol sur la dégradation enzymatique de la cocaïne au niveau d'un surnageant de foie humain.

Figure 24. Effets de l'éthanol sur les activités cocaïne méthyl et benzoyl esterase au niveau d'un surnageant hépatique humain.

Figure 25. Profil d'élution obtenu après chromatographie par échange d'anions.

Figure 26. Effets de l'éthanol sur la dégradation enzymatique de la cocaïne en présence de carboxylesterases partiellement purifiées (étape I).

Figure 27. Effets de l'éthanol sur les activités cocaïne méthyl et benzoyl esterase en présence de carboxylesterases partiellement purifiées (étape I).

Figure 28. Profil d'élution obtenu après filtration sur gel.

Figure 29. Effets de l'éthanol sur la dégradation enzymatique de la cocaïne en présence de carboxylesterases fortement purifiées (étape III).

Figure 30. Effets de l'éthanol sur les activités cocaïne méthyl et benzoyl esterase en présence de carboxylesterases fortement purifiées (étape III).

TABLEAUX

Tableau 1. Constantes cinétiques de l'hydrolyse de la cocaïne, du 4-méthylumbelliféryl acétate, de l'héroïne et de la 6-monoacétylmorphine.

Tableau 2. Formules des molécules à extraire.

Tableau 3. Rendements d'extraction obtenus avec des phases adsorbantes SCX et C8-SCX.

Tableau 4. Rendements d'extraction à trois pH différents.

Tableau 5. Paramètres d'identification et de quantification des molécules.

Tableau 6. Paramètres utilisés en CPG / SM.

Tableau 7. Tableau résumant l'obtention d'une gamme.

Tableau 8. Caractéristiques des courbes de calibration.

Tableau 9. Tableau résumant l'obtention des limites de linéarité.

Tableau 10. Evaluation de la répétabilité sur trois niveaux de concentration.

Tableau 11. Evaluation des rendements d'extraction selon la procédure d'extraction / dérivatisation.

Tableau 12. Tableau expliquant la réalisation d'une gamme étalon.

Tableau 13. Paramètres utilisés pour l'analyse de l'espace de tête par CPG / DIF selon deux méthodes.

LISTE DES ABREVIATIONS

ALAT : Alanine aminotransferase
ARNm : Acide ribonucléique messenger
ASAT : Aspartate aminotransferase
ATP : Adénosine triphosphate
BE : Benzoylecgonine
BSTFA : N-*tert*-butylsilyltrifluoroacétamide
CAT : Catalase
CCM : Chromatographie couche mince
CE : Cocaéthylène
CEh-1 : Carboxylesterase humaine forme 1
CEh-2 : Carboxylesterase humaine forme 2
CG : Chromatographie gazeuse
CH₂Cl₂ : Dichlorométhane
CIT : Courant ionique total
CLHP : Chromatographie liquide haute performance
COC : Cocaïne
CPG : Chromatographie phase gazeuse
CPL : Chromatographie phase liquide
CV : Coefficient de variation
Da : Dalton
DBD : Détection par barrettes de diode
DDP : Différence de potentiel
DIF : Détection par ionisation de flamme
DL₅₀ : Dose létale 50
DS : Déviation standard
DTT : Dithiothréitol

E : Ecgonine
 EDTA : Ethylènediaminetétracétate
 EEE : Ecgonine éthyl ester
 EME : Ecgonine méthyl ester
 EPS : Extraction phase solide
 ERO : Espèces réactives de l'oxygène
 ESM : Erreur standard sur la moyenne
 eV : Electron volt
 FAD : Flavine adénine dinucléotide
 GSH : Glutathion réduit
 GSH-Px : Glutathion peroxydase
 GSH-Rd : Glutathion réductase
 GSSG : Glutathion oxydé
 GST : Glutathion S-transferase
 H₂O : Eau
 H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
 H₃PO₄ : Acide orthophosphorique
 H₂SO₄ : Acide sulfurique
 HCl : Acide chlorhydrique
 HClO₄ : Acide perchlorique
 IC : Ionisation chimique
 IE : Impact électronique
 IPrOH : Isopropanol
 Kcat : Constante de catalyse enzymatique
 Km : Constante de Michaëlis
 MeOH : Méthanol
 m-hydroxy-BE : méta-hydroxy-benzoylecgonine
 MSTFA : N-éthyl-N-triméthylsilyltrifluoroacétamide
 MTBSTFA : N-*tert*-butyldiméthylsilyl-N-méthyltrifluoroacétamide
 MTT : Bromure de 3 (4, 5-diméthylthiazol-2-yl)-2, 5-diphényltétrazolium
 NH₄OH : Ammoniaque
 (NH₄)₂SO₄ : Sulfate d'ammonium

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NorBE : Norbenzoylecgonine
NorCE : Norcocaéthylène
NorCOC : Norcocaïne
O₂ : Oxygène
O₂^{•-} : Anion superoxyde
RPM : Rotation par minute
SCX : Strong Cation Exchange, colonne échangeuse de cations
SIR : Selected Ion Research
SM : Spectrométrie de masse
SNC : Système nerveux central
SOD / Cu-Zn : Superoxyde dismutase cuivre- zinc
SOD / Mn : Superoxyde dismutase manganèse
TMCS : Triméthylchlorosilane
TMS : Triméthylsilyl
TMSI : 1-N-(triméthylsilyl)-imidazole
uma : unités de masse atomique
UV : Ultraviolet

RESUME FRANÇAIS

Le but essentiel de notre travail a été d'étudier la capacité du foie, premier organe de métabolisation des xénobiotiques, à dégrader la cocaïne en présence d'éthanol, à l'aide de deux modèles expérimentaux, à savoir un modèle cellulaire (les hépatocytes de rat en suspension) et un modèle acellulaire (modèle reconstitué *in vitro* à partir d'enzymes purifiées de foie humain).

La première partie a pour objectifs de rechercher les voies de métabolisation de la cocaïne qui sont inhibées et / ou stimulées en présence d'éthanol, sur hépatocytes isolés de rat. Dans ce but, une méthode originale permettant de séparer et de quantifier simultanément la cocaïne, le cocaéthylène et huit de leurs métabolites respectifs a été développée par Chromatographie Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CPG / SM). Nos résultats préliminaires indiquent que l'éthanol aux trois concentrations testées (20, 40 et 80 mM) n'a aucun effet sur la cinétique de métabolisation de la cocaïne. Notre étude confirme que l'addition d'éthanol à des cellules hépatiques de rat en suspension supplémentées en cocaïne résulte en la formation précoce de benzoylecgonine et de cocaéthylène. L'apparition retardée d'ecgonine méthyl ester démontre l'activation d'une deuxième voie de détoxification. La production tardive d'ecgonine indique une dégradation de la benzoylecgonine et de l'ecgonine méthyl ester. De plus, la voie d'oxydation intervenant dans l'induction du stress oxydant en produisant de la norcocaïne est tardivement stimulée. Enfin, notre étude montre une métabolisation complète de la concentration initiale en éthanol par les hépatocytes de rat en suspension.

La deuxième partie a pour but de déterminer s'il existe d'autres enzymes que les carboxylesterases formes 1 et 2 humaines ayant une capacité à métaboliser la cocaïne seule ou associée à de l'éthanol. Pour ce faire, une méthode de micropurification par chromatographie liquide (Smart System®) a été mise au point. Dans le cadre de nos dosages *in situ* de la cocaïne, du cocaéthylène, de la benzoylecgonine, de l'acide benzoïque et de la lidocaïne, une technique par Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à une Détection par

Barrette de Diode (CLHP / DBD) et une méthode de dosage de l'éthanol par Chromatographie Phase Gazeuse couplée à une Détection par Ionisation de Flamme équipée d'un injecteur à espace de tête (espace de tête CPG / DIF) ont été développées. La procédure de purification nous a permis de suspecter la présence d'autres enzymes que les carboxylesterases formes 1 et 2 de foie humain impliquées dans le métabolisme de la cocaïne et déjà isolées. A partir d'un modèle enzymatique reconstitué *in vitro*, nos résultats préliminaires indiquent que d'autres estérases que les formes 1 et 2 de foie humain sont impliquées dans l'élimination de la cocaïne, produisant benzoylecgonine et ecgonine méthyl ester. De plus, nous avons montré que les sensibilités de ces enzymes à l'éthanol sont variables.

RESUME ANGLAIS

The main purpose of our work was to study the ability of the liver, as the first organ to metabolise xenobiotic substances, to degrade cocaine in the presence of ethanol. In order to do this, we used two experimental models, namely a cellular model (rat liver cells in suspension) and an a-cellular model (model reconstructed *in vitro* from purified human liver enzymes).

The purpose of the first part of our study was to look for cocaine metabolising processes which were inhibited and / or stimulated by the presence of ethanol, in isolated rat liver cells. With this aim in mind, an original method for simultaneously separating and quantifying cocaine, cocaethylene and eight of their respective metabolites was developed by Vapour Phase Chromatography coupled with Mass Spectrometry (VPC / MS). Our preliminary results point out that ethanol at three tested concentrations (20, 40 et 80 mM) have no effect on the kinetic of metabolism of cocaine. Our study confirms that the addition of alcohol to rat liver cells in suspension, supplemented with cocaine, results in the premature formation of ecgonine benzoyl ester and cocaethylene. The delayed appearance of ecgonine methyl ester shows that a second detoxification process is activated. The delayed production of ecgonine indicates a degradation of the ecgonine benzoyl ester and the ecgonine methyl ester. Moreover, the oxidising process which occurs during the induction of the oxidising stress, producing norcocaine, is stimulated at a late stage. Finally, our study shows the complete metabolism of the initial alcohol concentration by the rat liver cells in suspension.

The second part consisted in determining if enzymes other than human carboxylesterases 1 and 2, able to metabolise cocaine on its own or with alcohol, existed. To do this, a micropurification method using liquid phase chromatography (Smart System[®]) was developed. A technique based on High Performance Liquid Chromatography coupled with a Diode Array Detection (HPLC / DAD) in the *in situ* proportioning of cocaine, cocaethylene, ecgonine benzoyl ester, benzoic acid and lidocaine, and a method for proportioning alcohol by quantifying the head space using Vapour Phase Chromatography coupled with a Flame

Ionisation Detection (head space VPC / FID) were used. The purification procedure pointed to the presence of enzymes other than the human liver carboxylesterases, forms 1 and 2, involved in the metabolism of cocaine and already isolated. The preliminary results drawn from an enzymatic model reconstructed *in vitro* indicate that human liver carboxylesterases, other than forms 1 and 2, are involved in the elimination of cocaine, producing ecgonine benzoyl ester and ecgonine methyl ester. Moreover, we have shown that the sensitivity of these enzymes to alcohol is variable.

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

La concomitance cocaïne et éthanol est l'une des combinaisons de drogues les plus fréquentes. Selon Grant et Harford [*Grant et Harford, 1990*], plus de 80 % des cocaïnomanes américains consommeraient aussi de l'alcool. Le Centre Suisse d'Information Toxicologique, selon le rapport annuel de 1999, a relevé 245 intoxications (6,0 %) dans le groupe des produits d'agrément, drogues et alcool. Les rapports cliniques les plus fréquents concernent l'alcool (éthanol, 87 cas). Trois décès par intoxication à l'héroïne et à la cocaïne ont été enregistrés. L'usage de cocaïne est toujours aussi mal repéré par les systèmes d'information français existants. Sa part, probablement sous-estimée dans les statistiques disponibles (environ 2 % des interpellations pour usage et des recours aux soins), est toutefois restée relativement stable au cours du temps. Chez les sujets incarcérés, les produits pris en association montrent les fréquences suivantes en augmentation par rapport à 1995 : cannabis (49 % *versus* 41 %), médicaments (32 % *versus* 30 %), alcool (23 % *versus* 15 %). L'usage de cocaïne concerne 24 % des sujets (*versus* 29 %) [*Facy, 1997*].

L'abus simultané de cocaïne et d'éthanol est associé à un problème majeur de santé publique. Cette combinaison de drogues est identifiée comme l'abus le plus fréquent chez les individus présentés aux urgences avec un problème lié à une consommation de substance interdite [*Drug Abuse Warning Network, 1991*]. Ainsi des études épidémiologiques menées sur des cas mortels d'intoxication à la cocaïne associée à une consommation éthylique montrent que cette combinaison multiplie par dix huit le risque de mort soudaine par comparaison avec la cocaïne consommée seule [*Rose, 1990*].

La consommation de ce mélange est motivée par l'intensification et la prolongation des effets euphoriques [*Farré, 1993. Farré, 1997*], tandis que la phase de dysphorie qui leur fait suite serait réduite [(a)*Hearn, 1991*].

Bien que les effets observés de cette combinaison de drogues puissent résulter des effets pharmacologiques directs de la cocaïne additionnés à ceux de l'alcool, plusieurs études montrent que l'éthanol peut significativement altérer la pharmacocinétique de la cocaïne

[*Perez-Reyes et Jeffcoat, 1992. McCance-Katz, 1993. Hedaya et Pan, 1996. (b)Hedaya et Pan, 1997. Pan et Hedaya, 1999*]. Une co-administration d'éthanol avec de la cocaïne, chez les animaux expérimentaux et chez l'homme, indiquerait une inhibition du métabolisme de celle-ci [*Dean, 1993*], augmenterait les concentrations plasmatiques et cérébrales de cocaïne [*Farré, 1993. Farré, 1997. (a)Hedaya et Pan, 1997*] et entraînerait la formation d'un métabolite pharmacologiquement actif, le cocaéthylène [*Perez-Reyes et Jeffcoat, 1992. Farré, 1993. Mc Cance, 1993. Hedaya et Pan, 1996. Farré, 1997*].

En outre, la voie oxydative conduisant à la norcocaïne, précurseur d'entités radicalaires dont le norcocaïne nitroxyde, serait également stimulée [*Kloss, 1984*].

Ces différents mécanismes pourraient expliquer par quel biais la toxicité de la cocaïne se trouve renforcée quand celle-ci est consommée conjointement à de l'éthanol.

TRAVAUX ANTERIEURS

CHAPITRE I. LA COCAINE

I. GENERALITES	3
II. PHARMACOLOGIE	3
III. METABOLISME, PHARMACOCINETIQUE ET PHARMACODY- NAMIE	4
IV. TOXICITE	7
IV.1. NECROSE HEPATIQUE	9
IV.2. STRESS OXYDATIF	10
IV.2.1. PRODUCTION D'ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE	10
IV.2.2. DEFICIENCE DES SYSTEMES DE DEFENSE DE LA CELLULE	11
IV.3. HEPATOTOXICITE REVERSIBLE ET MECANISME DE DEFENSE	14

CHAPITRE I. LA COCAÏNE

I. GENERALITES

La cocaïne (COC) est l'un des stimulants naturels les plus actifs du système nerveux central (SNC). Ce composé est trouvé dans les feuilles d'*Erythroxylon coca Lam*, un arbuste d'Amérique du Sud, à des taux pouvant atteindre 2 % du poids sec. Isolée sous forme pure en 1855, elle est largement utilisée en médecine comme anesthésique local et de plus en plus par les toxicomanes pour ses propriétés stimulantes. Pour un usage anesthésiant, la cocaïne est administrée sous forme de chlorhydrate dans des solutions à 1-4 % pour les préparations ophtalmologiques et dans des solutions à 10-20 % pour les membranes du nez et de la gorge. En auto-administration, la cocaïne est communément prise sous forme de chlorhydrate par voie nasale ou par injection intraveineuse ou sous forme de base libre par «smoking» à des doses de 10-120 mg.

II. PHARMACOLOGIE

Les activités pharmacologiques de la cocaïne incluent le système nerveux central, le système cardiovasculaire [Foltin, 1995. Schindler, 1995] et les effets anesthésiques locaux [Johanson et Fischman, 1989].

La cocaïne est connue pour modifier le comportement de ceux qui en abusent régulièrement en donnant naissance à un besoin irrésistible de s'administrer de manière répétée cette drogue qui procure bien-être et euphorie. Cette altération du comportement serait à mettre en relation avec une surstimulation des neurones dopaminergiques du système

nerveux central. Le mécanisme d'action serait le suivant : la cocaïne, en inhibant la recapture de la dopamine par les neurones présynaptiques, accroîtrait la concentration en dopamine dans l'espace synaptique. En présence d'un excès de dopamine, les récepteurs situés sur la membrane postsynaptique seraient activés plus intensément et la transmission dopaminergique s'en trouverait amplifiée. La cible sur laquelle agirait et viendrait se fixer la cocaïne appartient au système de transport de la dopamine [Ritz, 1987]. Ainsi, bien que la cocaïne agisse indirectement, elle se comporte comme un agoniste de la dopamine.

En plus du système de recapture de la dopamine, la cocaïne empêcherait la recapture d'autres neurotransmetteurs, en particulier ceux de la norépinéphrine et de la sérotonine.

III. METABOLISME, PHARMACOCINETIQUE ET PHARMACODYNAMIE

La cocaïne est rapidement métabolisée dans l'organisme, avec une demi-vie plasmatique très variable d'un individu à l'autre, comprise entre 0,5 et 1,5 heures. Son volume de distribution à l'équilibre est d'environ 2 L / kg ; sa clairance plasmatique moyenne est de l'ordre de 2 L / min [Chow, 1986. Jaltow, 1987. Kumor, 1988].

Les estérases, classées en cholinestérases et carboxylestérases (EC 3.1.1.1) sont impliquées dans le métabolisme de la cocaïne prise seule ou simultanément à de l'alcool.

Les métabolites principaux sont la benzoylecgonine (BE), l'ecgonine méthyl ester (EME) et aussi, quoique en quantités plus faibles, la norcocaïne (NorCOC) et l'ecgonine (E) (Figure 1).

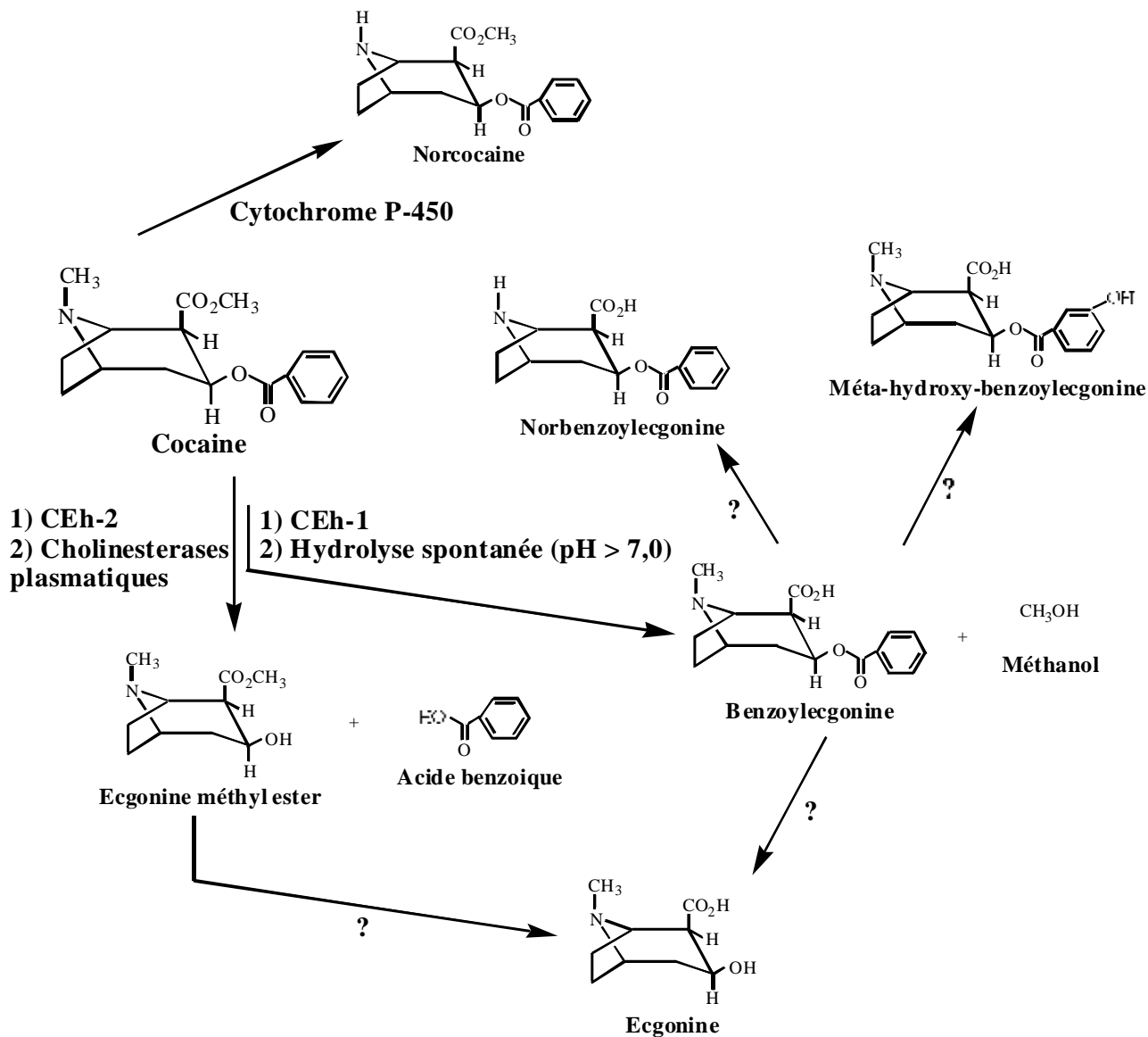


Figure 1. Voies métaboliques de la cocaïne.

Le métabolisme de la cocaïne et de ses principaux métabolites impliquent au moins trois différentes classes de réactions : hydrolyse spontanée, hydrolyse enzymatique et N-déméthylation.

La benzoylecgonine est obtenue après hydrolyse enzymatique par le biais d'une carboxylesterase hépatique. Une hydrolyse spontanée, lorsque le pH est supérieur à 7,0, peut également être invoquée (ce qui est le cas du sang). Après hydrolyse enzymatique par une carboxylesterase hépatique et des cholinestérases plasmatiques [Stewart, 1979. Gatley, 1991], ecgonine méthyl ester et acide benzoïque sont produits. Chez l'homme, deux carboxylesterases hépatiques, désignées par CEh-1 et CEh-2, sont impliquées dans le métabolisme [Dean, 1991. Brzezinski, 1994. Kamendulis, 1996]. La carboxylesterase humaine forme 1 catalyse l'hydrolyse du groupe méthyl ester de la cocaïne produisant de la benzoylecgonine et du méthanol. Ce trimère glycoprotéique (chaque sous-unité a une masse de 59 kDa) est caractérisé par un point isoélectrique de 5,8. L'hydrolyse du groupe benzoyl ester de la cocaïne, produisant ecgonine méthyl ester et acide benzoïque, est catalysée par une carboxylesterase forme 2 de foie humain. Cette glycoprotéine est un monomère de 60 kDa avec un point isoélectrique de 4,9. Les deux carboxylesterases présentent une large spécificité de substrats (Tableau 1). Les deux enzymes purifiées de foie humain sont impliquées dans la déacétylation de l'héroïne pour former la 6-monoacétylmorphine [Kamendulis, 1996. Brzezinski, 1997]. La carboxylesterase forme 2 catalyse aussi l'hydrolyse de la 6-monoacétylmorphine en morphine.

SUBSTRATS	K_m	k_{cat} / K_m	K_m	k_{cat} / K_m
	CEh-1		CEh-2	
	mM	$\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$	mM	$\text{mM}^{-1} \text{min}^{-1}$
Cocaïne	0,39	18,4	0,12	-
4-Méthylumbelliféryl acétate	0,15	$60,0 \times 10^3$	0,8	$2,0 \times 10^3$
Héroïne	6,8	314,0	6,3	69,0
6-Monoacétylmorphine	0,13	22,0	8,3	0,024

Tableau 1. Constantes cinétiques de l'hydrolyse de la cocaïne, du 4-méthylumbelliféryl acétate, de l'héroïne et de la 6-monoacétylmorphine.

Ces constantes cinétiques sont reproduites d'après les résultats du groupe de Pindel [Pindel, 1997].

IV. TOXICITE

L'abus de cocaïne est associé à une cardiotoxicité [Brody, 1990. Lange, 1990] et à une hépatotoxicité [Perino, 1987. Kanel, 1990. Wanless, 1990].

Des études précédentes montrent, dans les effets hépatotoxiques de la cocaïne, des variabilités interespèces, interraces et sexuelles [Evans et Harbison, 1978. Thompson, 1984].

Les métabolites principaux, benzoylecgonine et ecgonine méthyl ester, seraient toxicologiquement inactifs alors que la norcocaïne serait hépatotoxique [Kloss, 1984].

Le(s) mécanisme(s) par le(s)quel(s) est induite une hépatotoxicité ne sont à ce jour pas encore totalement élucidés.

Le métabolisme N-oxydatif de la cocaïne, c'est-à-dire la formation de norcocaïne, est médié par le cytochrome P-450 et des monooxygénases contenant une flavine adénine dinucléotide (FAD). Le cytochrome P-450 IIE1, forme inductible par l'éthanol, ne serait pas impliqué dans le métabolisme de la cocaïne [(a)Boelsterli, 1991]. Par contre, le cytochrome P-450 IIB1, forme principale inductible par le phénobarbital, a récemment été identifié comme l'isoforme responsable de la bioactivation de la cocaïne en norcocaïne [Boelsterli, 1992].

Au cours de ce métabolisme oxydatif (Figure 2), il y a production successivement de norcocaïne, de N-hydroxy-norcocaïne et de l'entité radicalaire norcocaïne nitroxyde. La norcocaïne est un métabolite actif de la cocaïne. Plus toxique que la cocaïne elle-même, elle entraîne une augmentation du taux des transaminases dans le sang. De plus, le cycle rédox entre la N-hydroxy-norcocaïne et le norcocaïne nitroxyde peut résulter en une perte du NADPH cellulaire et en la génération de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et d'anions superoxyde (O₂^{•-}). Ces deux espèces activées de l'oxygène peuvent stimuler la peroxydation lipidique et conduire à une hépatotoxicité [Raukman, 1982. Kloss, 1984].

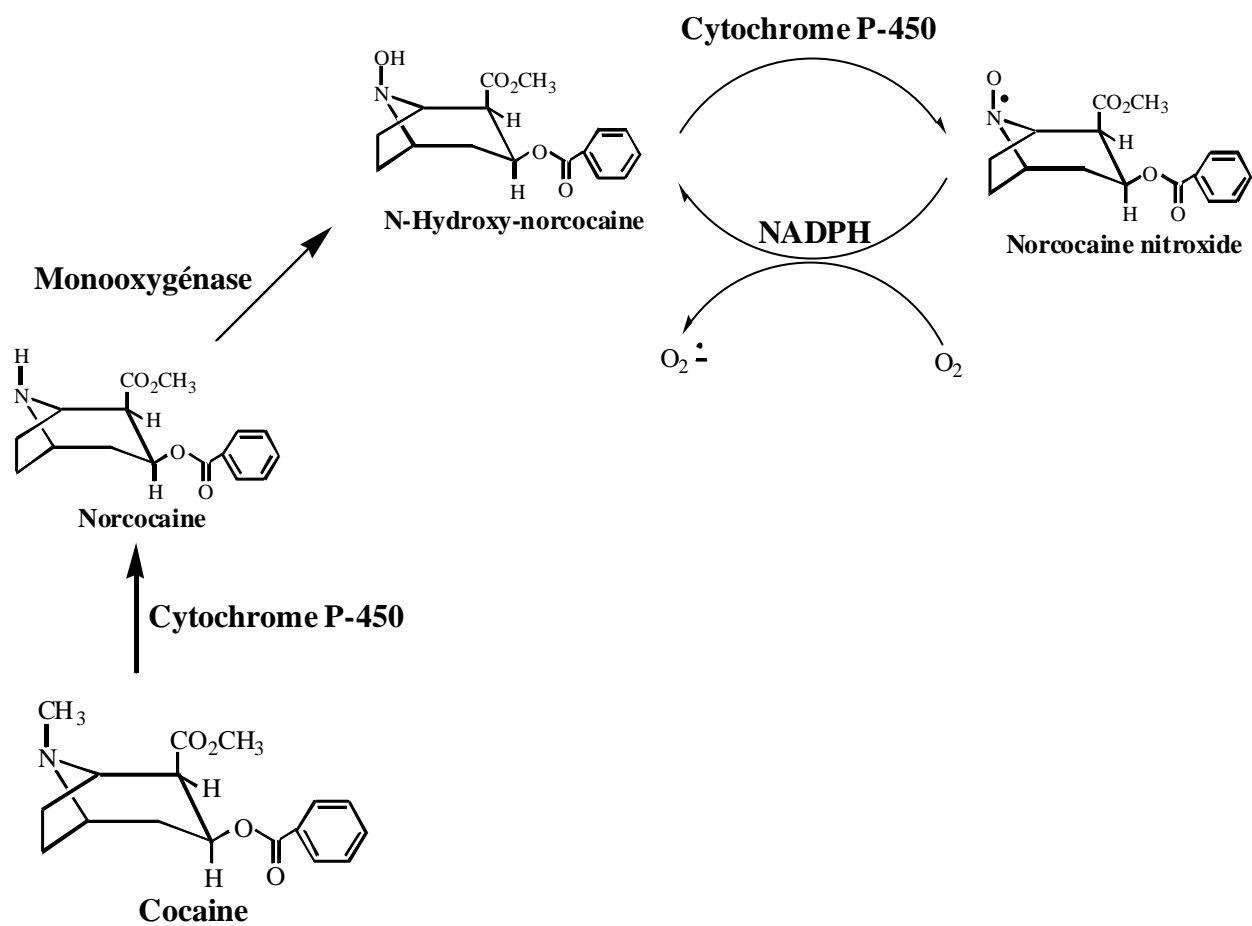


Figure 2. Métabolisme oxydatif de la cocaïne.

Un prétraitement par des inducteurs du cytochrome P-450 IIB1 comme l'Aroclor 1254 [Bouis, 1990], le phénobarbital [Thompson, 1979. Boelsterli, 1992. Roth, 1992] et l'éthanol [Smith, 1984. Boyer, 1990. (a)Boelsterli, 1991] résulte en une augmentation de la sévérité de l'hépatotoxicité chez les animaux expérimentaux. Bien que le norcocaïne nitroxyde soit reconnu comme le métabolite responsable des dommages hépatocellulaires [Thompson, 1979], ce radical libre est relativement stable et non réactif avec les protéines microsomales et le glutathion (GSH) [Rauckman, 1982].

Les mécanismes de toxicité hépatique attribués à la cocaïne, stress oxydatif et nécrose, sont méconnus. Des publications lient cette hépatotoxicité à deux mécanismes couramment associés aux dommages / à la mort cellulaires :

1-L'un s'effectue par liaison irréversible de métabolites de la cocaïne aux macromolécules cellulaires [Bouis et Boelsterli, 1990]. Ainsi des auteurs [Evans, 1983. Bouis et Boelsterli, 1990] rapportent une étroite corrélation entre nécrose hépatique induite par la cocaïne et liaison irréversible des intermédiaires électrophiles provenant de l'activation de la cocaïne aux protéines cellulaires. Cependant, les protéines cibles ne sont pas qualifiées à ce jour.

2-Le deuxième mécanisme implique la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Ces dernières sont produites durant le métabolisme oxydatif de la cocaïne, catalysé par le cytochrome P-450 et des monooxygénases flavine adénine dinucléotide dépendantes [Rauckman, 1982. Rosen, 1982. Boelsterli, 1993].

IV.1. NECROSE HEPATIQUE

Bien que la nécrose hépatique induite par la cocaïne soit bien documentée chez la souris [Evans, 1983. Kanel, 1990], les études avec les rats [Freeman, 1981. Evans, 1983] faisaient encore défaut récemment pour démontrer un tel effet.

Devi et Chan [Devi et Chan, 1996] sont les premiers à avoir démontré une nécrose hépatique induite par la cocaïne chez le rat. Celle-ci induit une nécrose des cellules parenchymateuses hépatiques avec augmentation sérique de bilirubine, d'aspartate aminotransférase (ASAT) et d'alanine aminotransférase (ALAT) [Shuster, 1977. Mehanny, 1991. Silva, 1991]. Chez les animaux de laboratoire (*in vivo* et *in vitro*), il est montré que les

dommages hépatiques sont accompagnés par une perturbation de l'homéostasie calcique intracellulaire, par des altérations de la synthèse cellulaire, du flux biliaire, de l'homéostasie énergétique [Bouis et Boelsterli, 1990. Boyer et Petersen, 1991. Jover, 1993. Sarpar, 1993] ainsi que par des atteintes biochimiques et morphologiques de la mitochondrie [Gottafried, 1986. Boyer, 1988. Boyer et Petersen, 1991. Léon-Velarde, 1992. Grant et Acosta, 1994].

IV.2. STRESS OXYDATIF

Le stress oxydatif hépatique induit par la cocaïne peut être d'origine multifactorielle :

- Augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par le cytochrome P-450 microsomal, par la chaîne mitochondriale de transport d'électrons et par la xanthine oxydase.
- Déficience des systèmes antioxydants.

Des études [Rosen, 1982. Evans, 1983. Bouis et Boelsterli, 1990. Boelsterli, 1993] montrent que la toxicité hépatique induite par la cocaïne (intoxications aiguë et chronique) est associée à un stress oxydatif, caractérisé par une accumulation d'espèces réactives de l'oxygène et de produits dérivant de lipides membranaires endommagés tels que les substances réactives de l'acide thiobarbiturique et les diènes conjugués [(a)Kloss, 1983. Boyer et Petersen, 1991. Goldlin et Boelsterli, 1991].

IV.2.1. PRODUCTION D'ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE

La cocaïne induit un stress oxydatif au niveau de foies adultes chez les animaux expérimentaux et sur cultures cellulaires de foie humain [(b)Kloss, 1983. (b)Boelsterli et Goldlin, 1991. Goldlin et Boelsterli, 1991. Jover, 1991. Boelsterli, 1993].

Il a été montré *in vitro* et *in vivo* que les changements structuraux et fonctionnels de la mitochondrie, principale source cellulaire d'anions superoxyde (dans un foie normal adulte, $3 \times 10^7 \text{ O}_2^\cdot$ sont produits / jour) [Ritcher, 1988]) et de peroxyde d'hydrogène, étaient dûs à la cocaïne et à ses métabolites [Gottafried, 1986. Boyer, 1988. Léon-Velarde, 1992. Bansal, 1994. Grant et Acosta, 1994].

De multiples mécanismes ont été proposés pour expliquer une atteinte mitochondriale [Fujii, 1994. Shigenaga, 1994]. Tandis qu'un prétraitement des rats avec du SKF-525A inhibe la génération d'espèces réactives de l'oxygène à partir de la mitochondrie, l'augmentation de celles-ci serait une conséquence de l'ischémie induite par la cocaïne [Garhart, 1989] ou du processus de bioactivation de la cocaïne ou des deux.

Devi et Chan [Devi et Chan, 1996] montrent qu'une exposition aigüe à la cocaïne résulte en une augmentation de l'activité de la xanthine oxydase hépatique (une source supplémentaire d'anions superoxyde). Ainsi l'ischémie induite par la cocaïne [Eichorn, 1992] peut représenter un autre mécanisme par lequel la cocaïne induit un stress oxydatif par augmentation de la génération d'anions superoxyde via la conversion de la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase [Friedl, 1989].

L'augmentation significative des espèces réactives de l'acide thiobarbiturique et des diènes conjugués [Devi et Chan, 1996] est accompagnée par une déplétion des pools cellulaires de glutathion et d'ATP. Ces résultats sont en accord avec des études précédentes [Suarez, 1986. Boyer et Petersen, 1991].

Bien qu'il ne peut être affirmé qu'une déplétion du glutathion mitochondrial puisse conduire à un dommage de la structure mitochondriale et des fonctions ou vice et versa, elle pourrait augmenter la vulnérabilité de la mitochondrie aux espèces réactives de l'oxygène. Le transport du glutathion dans la mitochondrie est un processus ATP-dépendant ; ainsi la déplétion du glutathion mitochondrial peut aussi être attribuée à une diminution de l'ATP cellulaire chez les rats exposés à la cocaïne.

IV.2.2. DEFICIENCE DES SYSTEMES DE DEFENSE DE LA CELLULE

Devi et Chan [Devi et Chan, 1996] ont montré qu'une augmentation du stress oxydatif causée par la cocaïne dans le foie de rat était accompagnée par des altérations des activités des enzymes antioxydantes nécessaires pour éliminer les espèces réactives de l'oxygène et les produits endommagés des lipides.

Les enzymes antioxydantes sont des enzymes spécifiques agissant directement sur les espèces réactives de l'oxygène. Elles jouent un rôle important dans la protection des cellules

contre les lésions oxydatives et un équilibre des taux de ces enzymes est nécessaire pour maintenir l'intégrité de la cellule normale et de l'homéostasie [Harris, 1992].

La réponse des enzymes antioxydantes au stress oxydatif induit par une atteinte hépatique due à la cocaïne et leur régulation sont pour la première fois étudiées par Devi et Chan [Devi et Chan, 1996]. L'étude du système de défense antioxydant dans le cadre d'une hépatotoxicité induite par la cocaïne est important parce qu'il peut contribuer à la compréhension des mécanismes responsables du dommage hépatique et présenter des indications pour des interventions thérapeutiques (diététiques ou pharmacologiques) afin de limiter les dommages hépatiques et avant que ceux-ci ne deviennent irréversibles.

Les systèmes cellulaires de défense de la cellule comprennent les enzymes antioxydantes superoxyde dismutases manganèse et cuivre-zinc (SOD / Mn et SOD / Cu-Zn), catalase (CAT), glutathion peroxydase (GSH-Px), glutathion réductase (GSH-Rd) et glutathion S-transferase (GST). La SOD / Mn (mitochondriale) et la SOD / Cu-Zn (cytosolique) catalysent la dismutation de l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 et O_2 . Catalase et glutathion peroxydase sont les principales enzymes impliquées dans la réduction de H_2O_2 en H_2O . La glutathion réductase permet la régénération du glutathion oxydé (GSSG) sous forme réduite. La glutathion S-transferase catalyse la conjugaison de substrats électrophiles et des xénobiotiques avec le glutathion.

D'après Devi et Chan [Devi et Chan, 1996], les augmentations d'espèces réactives de l'acide thiobarbiturique et des diènes conjugués induites par la cocaïne sont accompagnées par des élévations des SOD / Mn et Cu-Zn. De plus, il existe une corrélation directe entre l'augmentation des activités des superoxyde dismutases et celles des transcrits de ARNm. La réponse des SOD / Mn et Cu-Zn hépatiques pourraient représenter un mécanisme adaptatif à l'augmentation de la production d'anions superoxyde par la cocaïne. En fait, l'augmentation de la SOD / Mn, accompagnée par une augmentation de la génération des espèces réactives de l'oxygène, suggère que la mitochondrie pourrait être l'une des cibles (peut-être la première) du stress oxydant induit par la cocaïne. L'activation des SOD / Mn et Cu-Zn pourrait être un premier mécanisme de défense contre l'effet des anions superoxyde sur la mitochondrie et autres organites cellulaires. Le dommage hépatique pourrait être initié à ce stade, plus spécialement quand les enzymes ultérieures de protection, c'est-à-dire catalase, glutathion peroxydase et glutathion-S-transferase, ne fonctionnent plus en séquence. Comme indiqué par Devi et Chan [Devi et Chan, 1996], lorsque les SOD / Mn et Cu-Zn augmentent avec une

croissance concomitante de la catalase et de la glutathion peroxydase, une quantité significative de peroxyde d'hydrogène générée dans la mitochondrie et le cytoplasme pourrait initier une suite de réactions cytotoxiques en produisant des espèces réactives de l'oxygène [Brannan, 1981. De Haan, 1992. Aspberg et Tottmar, 1994]. Ces espèces réactives de l'oxygène peuvent réagir avec les membranes biologiques, particulièrement avec des acides gras polyinsaturés, endommageant les mitochondries et d'autres organites cellulaires avec perte de l'intégrité fonctionnelle.

Le rôle important joué par le glutathion dans la détoxification des espèces hautement réactives de l'oxygène n'est pas remis en cause [Meister, 1983]. Non seulement celui-ci réagit de manière covalente avec les ERO mais il sert aussi de substrat pour les enzymes GSH-Px et GST impliquées dans le relargage de peroxyde d'hydrogène et des produits toxiques de la peroxydation lipidique. La déplétion du pool cellulaire de glutathion peut être due à un ou plusieurs des éléments suivants : perturbation de la synthèse de glutathion, augmentation de l'efflux de celui-ci ou augmentation de son utilisation pour éliminer les espèces réactives de l'oxygène et produits venant des lipides endommagés [Lauterberg, 1982. Speisky, 1985. Pireson, 1986. Callans, 1987]. Dans le foie adulte, la maintenance d'un pool cellulaire de glutathion est un processus ATP-dépendant et la déplétion de glutathion reflète une atteinte des fonctions mitochondriales [Martensson, 1990. Wu, 1992. Takeshi, 1992. Garcia-Ruiz, 1994]. Donc une déplétion de la synthèse d'ATP par la cocaïne est une raison pour compromettre l'habilité des cellules à maintenir l'homéostasie du glutathion (le transport du glutathion dans la mitochondrie est un processus ATP-dépendant ; ainsi la déplétion du GSH mitochondrial peut aussi être attribuée à une déplétion de l'ATP cellulaire chez les rats exposés à la cocaïne).

De récents résultats [Devi et Chan, 1996] indiquent que la cocaïne induit une peroxydation lipidique et perturbe les enzymes antioxydantes. La corrélation la plus significative selon ces mêmes auteurs est celle existant entre les enzymes antioxydantes SOD / Mn et la GSH-Px et les mesures de la peroxydation lipidique.

Le stress oxydatif induit par la cocaïne au niveau du foie serait également dû à une augmentation de la bioactivation de la cocaïne par le cytochrome P-450 [Rauckman et Rosen, 1982]. Des auteurs [Boyer et Petersen, 1990. Jover, 1991] ont mis en évidence une diminution notable du glutathion et de l'ATP chez les souris traitées à la cocaïne ainsi que dans les cultures primaires de cellules hépatiques de rat adulte et humaines. Donc la cocaïne

entraîne un dommage hépatique via une peroxydation médiée par les espèces réactives de l'oxygène, l'oxydation des lipides membranaires et des groupements thiols. Un endommagement de la structure membranaire peut conduire à un dommage cellulaire irréversible et finalement, à la mort cellulaire.

IV.3. HEPATOTOXICITE REVERSIBLE ET MECANISME DE DEFENSE

Les mécanismes possibles par lesquels la cocaïne induit une nécrose du foie se focalisent sur le cytochrome P-450 et sur un système monooxygénasique contenant une flavine adénine dinucléotide [(a)Kloss, 1983. Boelsterli, 1992. Pellinen, 1994. Pansen, 1995]. La même chose est vraie pour le stress oxydatif induit par la cocaïne [Kloss, 1984. Teaf, 1984. Boelsterli, 1991].

Pour démontrer une éventuelle relation de cause à effet entre une augmentation de la peroxydation lipidique et le système de bioactivation de la cocaïne d'une part et l'atteinte mitochondriale d'autre part, des études précédentes ont exploré le rôle du cytochrome P-450 dans l'hépatotoxicité de la cocaïne en utilisant divers inhibiteurs de la famille des cytochromes P-450 3A et 2B (triacétyloléandomycine, chloramphénicol, 1-N-(2-p-nitrophénéthyl)chlorofluoroacétamide et SKF-525A) [Kloss, 1982. Roth, 1992. Pellinen, 1994]. Ces inhibiteurs entraînent une significative réversibilité des manifestations biochimiques et morphologiques de la nécrose hépatique chez les rats et souris traités à la cocaïne.

Devi et Chan [Devi et Chan, 1996] montrent qu'un prétraitement des rats avec le SKF-525A prévient largement l'accumulation d'espèces réactives de l'acide thiobarbiturique et la génération des ERO dans les fractions mitochondriales et restaurent légèrement les taux d'ATP et de glutathion. Ce même prétraitement améliore grandement les activités de la SOD / Mn et de la GSH-Px. Il faut cependant être conscient que de fortes doses ou des doses répétées de SKF-525A peuvent résulter en un dommage cellulaire [Gaelotti, 1983]. Les résultats produits par Devi et Chan [Devi et Chan, 1996] illustrent la participation des systèmes antioxydants de la cellule et de la mitochondrie dans le stress oxydatif induit par la

cocaïne. Cette étude suggère aussi que les effets délétères de la cocaïne sur le foie peuvent être prévenus par des inhibiteurs du processus de bioactivation.

Tous ces résultats montrent qu'il existe une corrélation directe entre le processus d'oxydation de la cocaïne et la peroxydation lipidique.

CHAPITRE II. COCAINE ET ALCOOL, UN COCKTAIL EXPLOSIF

I. GENERALITES	16
II. HISTORIQUE	16
III. EPIDEMIOLOGIE	18
IV. PHARMACOLOGIE	18
V. METABOLISME	19
VI. INTERACTIONS COCAINE ET ALCOOL : EFFETS SUR LA PHARMACOCINETIQUE ET LA PHARMACODYNAMIE DE LA COCAINE	20
VII. TOXICITE	20

CHAPITRE II. COCAINE ET ALCOOL, UN COCKTAIL EXPLOSIF

I. GENERALITES

Les « cocktails » de drogues semblent de plus en plus populaires et une drogue « légale » comme l'alcool est souvent associée à une drogue « illégale » comme la cocaïne. La consommation de ce mélange est motivée d'une part par le désir d'éprouver de nouvelles sensations, mais aussi par l'espoir d'intensifier et de prolonger les effets ressentis comme agréables et d'atténuer la phase de dysphorie qui leur fait suite. En plus des mécanismes classiques d'interaction (addition et / ou potentialisation des effets pharmacologiques), ces deux drogues présentent la particularité de réagir l'une avec l'autre pour former dans le foie une nouvelle drogue, le cocaéthylène (CE) ou éthylcocaïne ou éthylbenzoylecgonine. Le cocaéthylène serait plus euphorisant mais aussi plus toxique que la cocaïne ; ces effets dureraient également plus longtemps.

II. HISTORIQUE

C'est en 1979 que le groupe de Rafla et Epstein [*Rafla et Epstein, 1979*] a mis en évidence dans l'urine de toxicomanes consommant conjointement de l'alcool et de la cocaïne, la présence d'un homologue éthylié de cette dernière (le cocaéthylène) et de son métabolite, l'ecgonine éthyl ester (EEE) (Figure 3). Ces résultats seront confirmés quelques années plus tard par Smith [*Smith, 1984*].

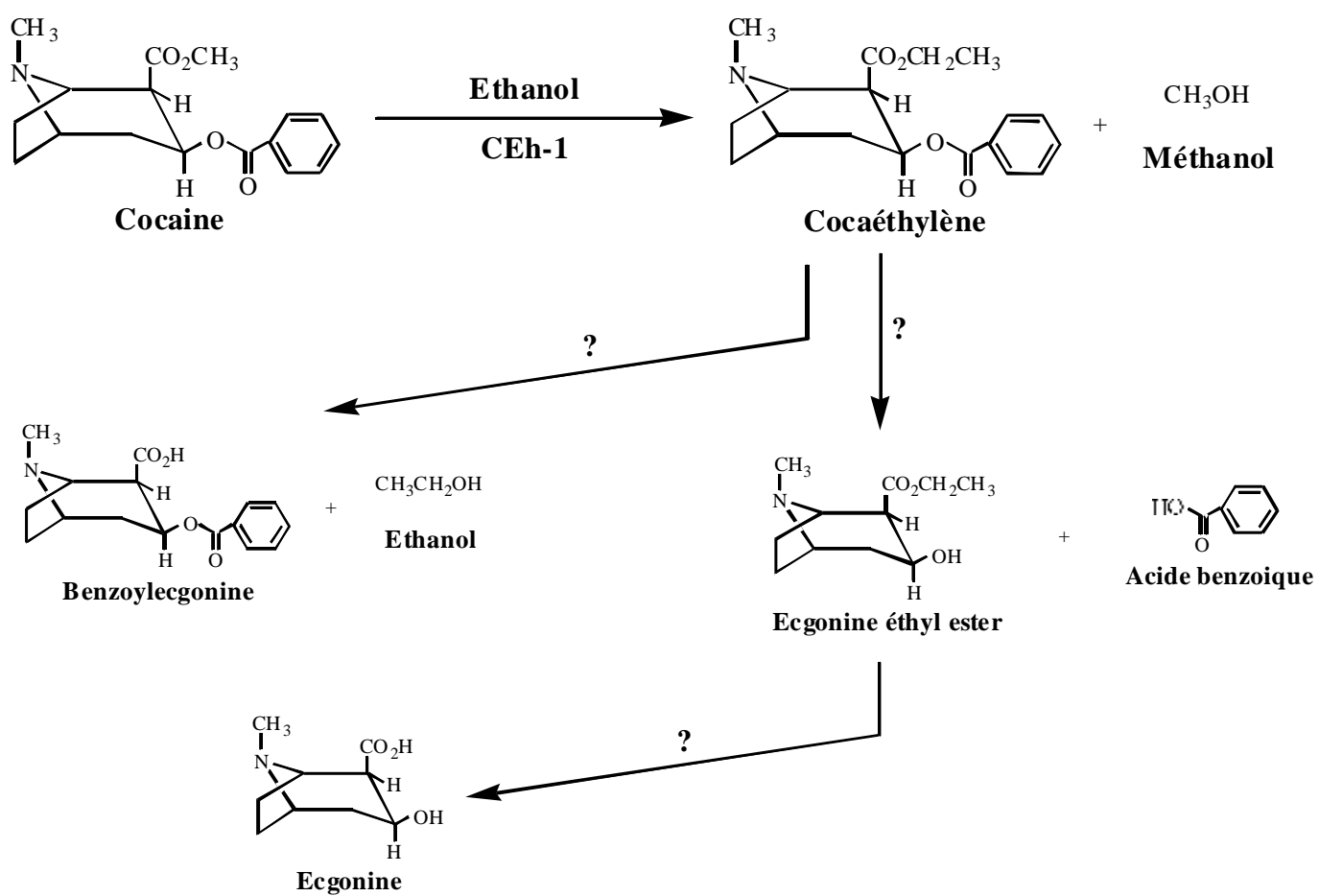


Figure 3. Voies métaboliques de la cocaïne en présence d'éthanol.

III. EPIDEMIOLOGIE

Le système mis en place aux Etats-Unis pour obtenir des données statistiques sur l'abus de drogues et ses conséquences sur la santé publique [*Drug Abuse Warning Network, 1991*] montre que la prise conjointe de cocaïne et d'éthanol est pratique courante au sein de la population des grandes métropoles américaines. Selon Grant et Harford [*Grant et Harford, 1990*], plus de 80 % des cocaïnomanes consommeraient aussi de l'éthanol. Selon certains de ces toxicomanes, la prise simultanée de cocaïne et d'alcool présenterait l'avantage de prolonger la durée de la période euphorique et d'atténuer les symptômes de dysphorie qui succèdent au « flash ».

IV. PHARMACOLOGIE

Ce n'est qu'en 1991 que plusieurs études convergentes ont démontré que le cocaéthylène était un métabolite actif de la cocaïne [(b)Hearn, 1991. Jatlow, 1991. Woodward, 1991] et que, par conséquent, il était susceptible d'altérer le comportement, d'entraîner des intoxications voire des décès.

Plusieurs études récentes montrent que les propriétés pharmacologiques de la cocaïne et de son homologue éthylé sont très semblables mais non identiques. Ainsi, dans des expériences de compétition réalisées *in vitro*, le groupe de Hearn [(a)Hearn, 1991] a démontré que le cocaéthylène présentait une capacité équivalente à la cocaïne à déplacer un ligand spécifique du transporteur de la dopamine, le mazindol. Cependant, le cocaéthylène est nettement moins actif que la cocaïne si l'on considère sa capacité à se fixer au transporteur de la norépinéphrine et de la sérotonine suggérant ainsi que le domaine d'action du cocaéthylène est plus restreint que celui de la cocaïne. Les mécanismes d'action de la cocaïne et du cocaéthylène présentent encore d'autres points communs : par exemple, l'injection intraveineuse de cocaïne ou de cocaéthylène résulte en un même accroissement du taux de dopamine extracellulaire dans le *nucleus accumbens* du rat [Jatlow, 1991]. D'autres études complémentaires à celle du groupe de Hearn [(a)Hearn, 1991] et réalisées par le groupe de

Woodward [Woodward, 1991] montrent que le cocaéthylène inhibe avec la même efficacité que la cocaïne la capture de la dopamine marquée au niveau de synaptosomes isolés du *corpus striatum* de cerveau de rat.

Parallèlement à ces études pharmacologiques, l'effet du cocaéthylène sur le comportement des rats [Jaltow, 1991. Woodward, 1991] et des singes [Jaltow, 1991] a été évalué et comparé à celui de la cocaïne par des tests psychomoteurs [Jaltow, 1991] ou de renforcement [Jaltow, 1991. Woodward, 1991]. Des courbes dose / réponse similaires ayant été obtenues pour la cocaïne et son homologue éthylé, il est supposé que ces deux substances possèdent des propriétés psychostimulantes très semblables. Il faut toutefois rester prudent quant à l'extrapolation de ces résultats à l'être humain. Une étude a cependant montré que l'effet subjectif ressenti après une prise conjointe de cocaïne et d'alcool est plus intense que celui vécu après une prise de cocaïne seule [Farré, 1990].

V. METABOLISME

En présence d'éthanol, la carboxylesterase forme 1 catalyse aussi l'éthyl transesterification de la cocaïne pour former du cocaéthylène et du méthanol (Figure 3) [Dean, 1991. Brzezinski, 1994]. Si le cocaéthylène a les propriétés pharmacologiques et toxicologiques de la cocaïne, il présente une demi-vie plus longue (deux heures en comparaison de quarante minutes pour la cocaïne) [Woodward, 1991. Katz, 1992. Randall, 1992. Mc Cance, 1995].

Des expériences menées avec des homogénats de différents tissus suggèrent que le foie est l'organe où s'effectue l'éthyl transesterification de la cocaïne en cocaéthylène [(b)Hearn, 1991]. La même étude montre qu'aucune trace de cocaéthylène n'est détectable lorsque cocaïne et éthanol sont coïncubés avec des homogénats de cerveaux ou des échantillons de sang complet. Par contre, ce métabolite est détecté dans le plasma et dans le fluide extracellulaire cérébral seulement lorsque cocaïne et éthanol sont coadministrés. La substitution de la cocaïne par la benzoylecgonine empêche toute formation de cocaéthylène par les homogénats de foie suggérant ainsi que le cocaéthylène est le résultat direct d'une

transesterification entre cocaïne et éthanol. La production de cocaéthylène par des homogénats de foie de souris est très rapide, le taux maximal étant atteint après 15 minutes [(b)Roberts, 1992]. Lorsque la concentration d'éthanol diminue, la cocaïne, et probablement aussi le cocaéthylène, sont hydrolysés en benzoylecgonine. Le cocaéthylène peut également être converti en ecgonine éthyl ester. Ce métabolite a été détecté par plusieurs groupes [Rafla, 1979. Wu, 1992].

VI. INTERACTIONS COCAINE ET ALCOOL : EFFETS SUR LA PHARMACOCINETIQUE ET LA PHARMACODYNAMIE DE LA COCAINE

La coadministration d'éthanol augmente les activités pharmacologiques de la cocaïne, spécialement au niveau du système nerveux central [Pan, 1999].

Après une administration intrapéritonéale d'éthanol chez le rat, le taux d'absorption de la cocaïne augmente ainsi que sa distribution au niveau des tissus.

La coadministration d'éthanol inhibe le métabolisme de la cocaïne *in vivo* et sur des préparations *in vitro* au niveau du foie de souris et du foie humain [Dean, 1993. Farré, 1993. Roberts, 1993]. De ce fait, les effets combinés de ces changements pharmacocinétiques augmentent et prolongent les concentrations plasmatiques en cocaïne.

VII. TOXICITE

La consommation conjointe de cocaïne et d'éthanol aurait des conséquences cardiovasculaires [Foltin, 1988. Foltin, 1989. Perez-Reyes, 1992. Uszenski, 1992. Farré, 1993. Higgins, 1993. Mc Cance-Katz, 1993. Higgins, 1996], hépatotoxiques [Kloss, 1984. Boyer, 1990. Ponsoda, 1992. Odeleye, 1993] et tératogènes [Church, 1991].

Les mécanismes par lesquels le cocaéthylène produit des symptômes de toxicité et entraîne une létalité sont encore mal élucidés ; les sites d'action seraient multiples.

Hormis la production d'un métabolite pharmacologiquement actif et potentiellement toxique (le cocaéthylène), l'éthanol pris avec de la cocaïne décroît le taux de détoxification, par production de benzoylecgonine et d'ecgonine méthyl ester, de celle-ci [Roberts, 1993].

La présence d'éthanol pourrait induire des voies métaboliques alternatives comme l'oxydation du groupe N-méthyl de la cocaïne par le système du cytochrome P-450 formant la norcocaïne [Kloss, 1984]. Celle-ci est le précurseur d'entités radicalaires potentiellement plus hépatotoxiques que la cocaïne [Thompson, 1979. Kloss, 1984. Boelsterli et Goldlin, 1991. Mallat, 1991]. De plus, le cocaéthylène, à la manière de la cocaïne, pourrait lui-même être à l'origine de la production de norcocaéthylène (NorCE) et de norcocaéthylène nitroxyde (Figure 4).

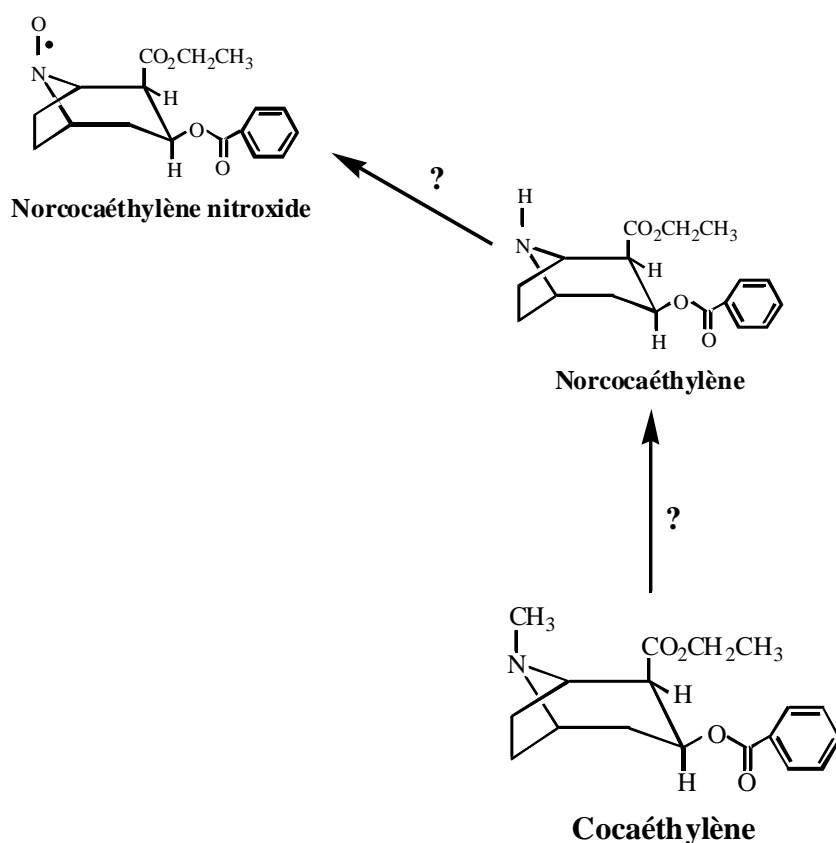


Figure 4. Métabolisme oxydatif du cocaéthylène.

Ce métabolite présente donc les mêmes effets hépatotoxiques que la cocaïne chez la souris [(b)Roberts, 1992] mais avec un potentiel plus grand dans la production de la létalité [(b)Hearn, 1991].

Le groupe de Hearn [(b)Hearn, 1991] a comparé la toxicité aigüe de la cocaïne et de son homologue éthylé chez la souris et a pu montrer que la DL_{50} du cocaéthylène (62,3 mg / kg) était nettement inférieure à celle de la cocaïne (93,0 mg / kg). En outre, leur étude suggère que la toxicité produite par le cocaéthylène pourrait venir s'ajouter à celle due à la cocaïne. Concernant l'être humain, des symptômes de toxicité apparaissent lorsque les taux sanguins de cocaïne excèdent 0,1 mg / L. Des taux supérieurs à 1 mg / L seraient généralement considérés comme étant potentiellement létaux [Smart, 1987]. Chez des individus décédés après avoir consommé cocaïne et alcool, des concentrations de cocaïne allant de moins de 0,01 mg / L jusqu'à 4,03 mg / L ont pu être mesurés. Les taux correspondant de cocaéthylène se situaient dans la fourchette 0,03-0,31 mg / L [(b)Hearn, 1991]. Au cours de ce même travail, une étude statistique a montré que le taux de cocaéthylène sanguin et une variable mesurant le degré d'interaction cocaïne / éthanol (le produit des concentrations d'éthanol et de cocaïne) étaient des paramètres dépendant l'un de l'autre. L'analyse du cerveau et du foie a montré que ces deux organes contenaient du cocaéthylène. Les taux étaient particulièrement élevés au niveau hépatique, lieu de synthèse probable du cocaéthylène. Dans une autre étude, l'analyse d'échantillons de sang [Jatlow, 1991] prélevés *post-mortem* et tous positifs pour l'éthanol et la cocaïne a montré que ceux-ci contenaient du cocaéthylène jusqu'à la concentration de 1,45 mg / L. Dans la moitié des cas examinés, le taux de cocaéthylène excédait même celui de la cocaïne.

Il semble donc pertinent de postuler que la mortalité accrue qui en résulte (par rapport à une consommation de cocaïne seule) [Kreek, 1984] soit à attribuer au moins partiellement aux effets du cocaéthylène.

CHAPITRE III. LE FOIE

I. INTRODUCTION	23
II. METABOLISME DES XENOBIOTIQUES PAR LES HEPATOCYTES ISOLES	24
III. UTILISATION DES HEPATOCYTES ISOLES POUR DES ETUDES DE TOXICITE	26
IV. UTILISATION D'UN MODELE ACELLULAIRE POUR DES ETUDES DE TOXICITE	27
V. INTERETS DES MODELES HEPATIQUES CHOISIS	27

CHAPITRE III. LE FOIE

Le foie représente 2 à 5 % du poids corporel chez l'adulte (1400 à 1600 g chez l'homme ; environ 10 g chez un rat de 180-200 g). L'unité fonctionnelle est le lobule ou acinus, délimité par les terminaisons des veines centrolobulaires et les espaces porte [*Kiernan, 1833. Rappaport, 1954*].

Le foie est composé de plusieurs types cellulaires : les hépatocytes, les cellules sinusoidales (cellules de Kupffer, cellules endothéliales, lipocytes ou cellules de Ito et lymphocytes résidents ou Pit cells), les cellules biliaires et les cellules mésenchymateuses et nerveuses. Les hépatocytes constituent près des deux tiers de la population cellulaire totale d'un foie de rat et environ 80 % chez l'homme [*Gates, 1961*]. Environ 20-22 cellules parenchymateuses disposées en travées séparent un espace porte d'une veine centrolobulaire. Il existe une relation étroite entre l'activité fonctionnelle et la localisation intralobulaire des hépatocytes [*Gebhardt, 1992*].

I. INTRODUCTION

Le foie est le principal organe impliqué dans la métabolisation des xénobiotiques. La plupart de ceux-ci sont lipophiles et ne peuvent être éliminés sans être métabolisés au préalable en molécules plus hydrosolubles. De nombreux composés sont captés par les hépatocytes et transformés en métabolites pharmacologiquement actifs ou inactifs, ou en métabolites toxiques. Les enzymes de biotransformation sont habituellement classées en deux groupes. Les enzymes de phase I introduisent un groupement fonctionnel dans la molécule et incluent notamment les réactions d'oxydation, d'hydrolyse et de réduction. Cette étape, appelée fonctionnalisation, rend les molécules moins hydrophobes et permet leur conjugaison.

Les réactions assurées par les enzymes de phase II correspondent aux conjugaisons. Les oxydations par les monooxygénases dépendantes des cytochromes P-450, localisées dans les membranes du réticulum endoplasmique, sont les principales enzymes de phase I. Le système monooxygénasique comprend trois constituants majeurs : un groupe d'hémoprotéines appelées cytochromes P-450, une flavoprotéine (la NADPH cytochrome P-450 réductase) et une fraction lipidique qui est une partie intégrante de la membrane. Les cytochromes P-450 constituent une super famille d'enzymes subdivisées en familles et sous familles d'après leur séquence d'acides aminés [Nelson, 1991], ce qui explique la faible spécificité du système monooxygénasique vis-à-vis des substrats. Chez les mammifères, le métabolisme des xénobiotiques est assuré par quatre familles composées de nombreuses enzymes [Nelson, 1991. Gonzalez, 1992]. Les enzymes de phase II comprennent les UDP-glucuronyl-transférases, les sulfotransférases, les glutathion S-transférases et les époxydes hydrolases. Elles constituent également des familles multigéniques. Quantitativement, la glucuro-conjugaison représente la réaction de conjugaison la plus importante.

Des processus de régulation complexes, impliquant divers facteurs endogènes et exogènes, influencent le métabolisme hépatique *in vivo*. Pour cette raison, les modèles expérimentaux *in vitro* sont plus simples pour étudier le métabolisme et la toxicité des xénobiotiques, en particulier les hépatocytes isolés ou en culture. La plupart des études ont été réalisées à partir de cellules de rongeurs, ce qui rend discutable l'extrapolation des résultats à l'homme car des différences qualitatives et quantitatives dans le métabolisme hépatique des xénobiotiques sont fréquentes entre les espèces.

II. METABOLISME DES XENOBIOTIQUES PAR LES HEPATOCYTES ISOLEES

Plusieurs méthodes ont été proposées pour isoler les hépatocytes de diverses espèces avec des résultats très différents quant au rendement cellulaire et au maintien des fonctions spécifiques. Des hépatocytes viables peuvent maintenant être aisément obtenus en grandes quantités par dissociation enzymatique du foie. Les suspensions d'hépatocytes fraîchement

isolés ont l'avantage de constituer une population cellulaire homogène et d'exprimer des activités fonctionnelles comparables à celles présentes *in vivo*. Les hépatocytes en suspension restent capables de métaboliser pendant quelques heures une grande variété de composés par les enzymes de phases I et II. Les métabolites produits par les monooxygénases dépendantes du cytochrome P-450 peuvent ensuite être conjugués par l'acide glucuronique, un sulfate ou le glutathion.

Dans les cellules entières, le métabolisme des xénobiotiques est intimement lié à d'autres fonctions cellulaires. Thurman et Kauffman [Thurman et Kauffmann, 1980] ont distingué au moins quatre types de régulation qui peuvent agir sur le système oxydatif mixte : l'induction, la quantité de substrats et de cofacteurs, l'activation et l'inhibition par des effecteurs, et les réactions de compétition.

Le métabolisme des xénobiotiques dans les hépatocytes en suspension peut être influencé par d'autres composés. De nombreuses études ont porté sur les effets de l'éthanol sur le système oxydatif mixte. De façon générale, des concentrations élevées d'éthanol inhibent l'oxydation des xénobiotiques tandis que de faibles concentrations peuvent avoir un effet stimulant [(b)Grundin, 1975]. Ainsi, l'oxydation de l'alprénolol dans les hépatocytes de rat est augmentée en présence de faibles concentrations d'éthanol mais elle est inhibée en présence de 10 mM [(a)Grundin, 1975].

Il est bien admis que la distribution intralobulaire des enzymes du métabolisme des xénobiotiques est hétérogène. Cette hétérogénéité apparaît conservée après isolement des cellules.

En résumé, les hépatocytes fraîchement isolés expriment les activités enzymatiques de phases I et II normalement présentes dans le foie entier. Ils constituent par conséquent un système approprié pour déterminer le métabolisme hépatique des xénobiotiques. La possibilité d'étudier de nombreux paramètres comme les effets dose-réponse, les effets d'inhibiteurs... à partir de la même suspension cellulaire initiale constitue un avantage considérable. Cependant, les hépatocytes ont, en suspension, une durée de vie courte, limitée à quelques heures. La survie prolongée des hépatocytes n'est possible que s'ils sont maintenus en culture, attachés à un support.

III. UTILISATION DES HEPATOCYTES ISOLEES POUR DES ETUDES DE TOXICITE

De nombreux xénobiotiques peuvent altérer soit directement, soit après métabolisation en composés toxiques, les fonctions hépatocellulaires. Le dommage cellulaire peut être induit par la formation d'un complexe stable (non covalent) avec une protéine ou un autre constituant intracellulaire, via la formation d'un composé chimiquement réactif, ou encore par des changements physicochimiques intracellulaires ou de l'environnement péricellulaire [Bridges, 1983]. Le dommage cellulaire peut être limité ou empêché par divers systèmes de défense qui incluent les enzymes du métabolisme des xénobiotiques, les protéines de liaison, les antioxydants et les enzymes qui métabolisent l'oxygène actif.

Les hépatocytes isolés ont été largement utilisés comme système d'évaluation d'une toxicité [Fry, 1979. Grisham, 1979. Klaassen, 1982]. Ils peuvent également servir de test de screening de composés toxiques. La cytotoxicité est habituellement appréciée par la mesure d'enzymes libérées dans le milieu, par les changements morphologiques observés au microscope photonique et / ou par la viabilité cellulaire déterminée par le test du bleu trypan. Le test au MTT apparaît comme un paramètre non spécifique de la cytotoxicité.

Le dommage cellulaire peut être grandement influencé par l'environnement et le taux de captage du xénobiotique étudié. Les paramètres environnants, comme la pression d'oxygène et la composition du milieu d'incubation, doivent être soigneusement définis. Ainsi la concentration calcique peut fortement influencer le degré de toxicité induite par divers composés dans des hépatocytes en suspension. La toxicité est plus élevée en absence de calcium extracellulaire [Lake, 1982. Fariss, 1984] ; ceci est sans doute dû à une peroxydation des lipides et à une déplétion en glutathion [Fariss, 1984]. Le processus de captage d'un xénobiotique peut être modifié par interaction avec un autre composé ou son métabolite, ou encore par prétraitement du foie [Corona, 1973].

Les hépatocytes en suspension ont été utilisés pour étudier les changements morphologiques et biochimiques induits par divers composés. Ce système permet l'analyse des mécanismes moléculaires impliqués dans la toxicité par des agents hépatotoxiques.

Les hépatocytes en suspension ont une durée de vie brève et ne peuvent être utilisés pour l'étude des effets chroniques des composés hépatotoxiques. Toutefois, il faut rappeler

que plusieurs enzymes du métabolisme des xénobiotiques sont altérés en culture ; il est également observé une baisse brutale du cytochrome P-450.

IV. UTILISATION D'UN MODELE ACELLULAIRE POUR DES ETUDES DE TOXICITE

Au-delà du modèle cellulaire, le modèle enzymatique [Dean, 1991. Brzezinski, 1994. Kamendulis, 1996. Brzezinski, 1997. Pindel, 1997] présente une autre façon d'approcher le métabolisme de la cocaïne associée à une prise éthylique. En effet, les enzymes purifiées ont un temps retenu l'attention. Elles représentaient la possibilité d'identifier une voie métabolique. Toutefois les inconvénients sont nombreux : difficultés et coût de purification, perte d'activité lors de la fixation de l'enzyme sur un support et utilisation pendant une durée habituellement limitée à quelques heures [Burchell, 1989].

Aussi les chercheurs ont recours aujourd'hui à des cellules génétiquement modifiées dont les avantages sont indiscutables (multiplication rapide et continue, facilité d'utilisation).

Au total, si les modèles acellulaires peuvent apporter des informations utiles, les performances restent inférieures en regard des modèles cellulaires pour l'établissement du risque toxicologique.

V. INTERETS DES MODELES HEPATIQUES CHOISIS

Au cours des dix dernières années, les hépatocytes adultes isolés et en culture ont été de plus en plus utilisés comme modèle expérimental pour des études de pharmacotoxicité. Les hépatocytes en suspension expriment la plupart des fonctions du foie entier, ce qui en fait un système approprié à l'étude du métabolisme et de la cytotoxicité des xénobiotiques et à celle des effets de ces composés sur le métabolisme cellulaire. Les hépatocytes en culture

permettent des études plus longues mais la disparition précoce du cytochrome P-450 et de certaines enzymes du métabolisme des xénobiotiques en limite l'utilisation.

En résumé, différents aspects du métabolisme des xénobiotiques ont été étudiés à partir de suspensions ou de cultures à court terme d'hépatocytes provenant d'animaux normaux ou prétraités. De nombreux travaux ont montré la validité de ces systèmes pour l'étude du métabolisme et de la cytotoxicité aiguë hépatique des agents chimiques. Par contre, les études à long terme sont limitées par la disparition rapide du cytochrome P-450 et de divers enzymes du métabolisme des xénobiotiques.

Aussi nous avons choisi d'étudier le métabolisme de la cocaïne associée à une prise éthylique selon un modèle cellulaire tel que les hépatocytes isolés de rat en suspension et selon un modèle acellulaire reconstitué *in vitro* à partir d'enzymes fortement purifiées de foie humain.

PARTIE EXPERIMENTALE

OBJECTIFS DE NOTRE TRAVAIL

L'analyse des données de la littérature montre que peu de travaux ont étudié les effets de l'éthanol sur les différentes voies métaboliques de la cocaïne au niveau d'hépatocytes isolés de rat en suspension [Figliomeni, 1997]. De plus, si deux carboxylesterases de foie humain ont été identifiées, la présence d'autres isoformes est supposée mais non démontrée [Brzezinski, 1994. Brzezinski, 1997. Pindel, 1997]. Et à notre connaissance, aucune étude ne relate les effets potentiellement inhibiteurs de l'éthanol sur un modèle reconstitué *in vitro*.

Le but essentiel de notre travail est donc d'étudier la capacité du foie, premier organe de métabolisation des xénobiotiques, à dégrader la cocaïne en présence d'éthanol. Notre approche expérimentale s'effectuera à l'aide de deux modèles, à savoir un modèle cellulaire (les hépatocytes de rat en suspension) et un modèle acellulaire (modèle reconstitué *in vitro* à partir d'enzymes fortement purifiées de foie humain).

Si les suspensions d'hépatocytes isolés de rat présentent l'avantage de permettre d'étudier les effets de l'éthanol sur le métabolisme de la cocaïne dans sa totalité, un système reconstitué *in vitro* permet d'analyser une voie métabolique de façon plus précise.

Le travail décrit ci-après se scinde en deux parties, chacune ayant pour caractéristique un modèle expérimental spécifique.

La partie I (Etude des interactions cocaïne-éthanol sur un modèle cellulaire constitué d'une suspension d'hépatocytes isolés de rat) a pour objectifs de rechercher les voies de métabolisation de la cocaïne qui sont inhibées et / ou stimulées en présence d'éthanol, sur hépatocytes isolés de rat (Chapitre VII). Dans ce but, une méthode originale permettant de séparer et de quantifier simultanément la cocaïne, le cocaéthylène et huit de leurs métabolites respectifs a été développée par CPG / SM (Chapitres IV, V et VI).

La partie II (Etude des interactions cocaïne-éthanol sur un modèle enzymatique fortement purifié obtenu à partir d'un foie humain) a pour but de déterminer s'il existe d'autres enzymes que les carboxylesterases formes 1 et 2 humaines ayant une capacité à métaboliser la cocaïne seule ou associée à de l'éthanol (Chapitre II). Pour ce faire, une

Objectifs de notre travail

méthode de micropurification par chromatographie liquide (Smart System[®]) a été mise au point (Chapitre I). Dans le cadre de nos dosages *in situ* de la cocaïne, du cocaéthylène, de la benzoylecgonine, de l'acide benzoïque et de la lidocaïne, une technique par CLHP / DBD et une méthode de dosage de l'éthanol par quantification de l'espace de tête par CPG / DIF ont été développées.

PARTIE I

**ETUDE DES INTERACTIONS COCAINE-
ETHANOL SUR UN MODELE CELLULAIRE
CONSTITUE D'UNE SUSPENSION D'HEPATO-
CYTES ISOLÉS DE RAT**

Avant de pouvoir étudier les effets de l'éthanol sur le métabolisme de la cocaïne au niveau d'hépatocytes isolés de rat, il est primordial de pouvoir isoler par extraction et analyser par CPG / SM la cocaïne, le cocaéthylène et huit de leurs métabolites respectifs. Notre attention s'est portée plus spécialement sur l'ecgonine. En effet, du fait de son extrême polarité due à la présence des fonctions amine, carboxyle et hydroxyle, sa caractérisation est très délicate. Nous nous sommes inspirés de récents travaux pour mettre au point notre méthode [*Peterson, 1995. Smirnow et Logan, 1996*].

CHAPITRE IV. CHOIX ET MISE AU POINT DE LA METHODE D'EXTRACTION / DERIVATISATION DE LA COCAINE, DU COCAETHYLENE ET DE HUIT DE LEURS METABOLITES RESPECTIFS

I. PRODUITS ET MATERIEL	32
I.1. PRODUITS CHIMIQUES	32
I.1.1. COMPOSES D'INTERET	33
I.1.2. AUTRES PRODUITS ET SOLUTIONS	33
I.2. MATERIEL	34
II. DEFINITION DU MODE D'EXTRACTION	34
III. SELECTION DE LA PHASE ADSORBANTE	36
IV. OPTIMISATION DES CONDITIONS D'EXTRACTION SUR LA PHASE ADSORBANTE C8-SCX	39
IV.1. CHOIX DU pH DE L'ECHANTILLON	39
IV.2. CHOIX DES SOLVANTS DE LAVAGE	41
IV.3. CHOIX DES SOLVANTS D'ELUTION	42
V. CHOIX DE L'AGENT DE DERIVATISATION	43
VI. CONCLUSION	44

CHAPITRE IV. CHOIX ET MISE AU POINT DE LA METHODE D'EXTRACTION / DERIVATISATION DE LA COCAINE, DU COCAETHYLENE ET DE HUIT DE LEURS METABOLITES RESPECTIFS

Durant cette dernière décade, les méthodes de séparation ont pris une très grande importance dans l'analyse de matrices complexes ou dans l'étude d'analytes dont les concentrations sont à l'état de traces.

Afin d'identifier la cocaïne, le cocaéthylène et huit de leurs métabolites respectifs, nous avons développé une méthode d'extraction / dérivation impliquant quatre étapes majeures :

- le choix du mode d'extraction.
- la sélection de la phase adsorbante.
- les essais sur la phase adsorbante.
- le choix de l'agent de dérivation.

I. PRODUITS ET MATERIEL

I.1. PRODUITS CHIMIQUES

I.1.1. COMPOSES D'INTERET

Les ampoules de 1 mL dosées à 1 g / L (benzoylecgonine, benzoylecgonine-d₃, norbenzoylecgonine·HCl, méta-hydroxy-benzoylecgonine, cocaïne, cocaïne-d₃, ecgonine éthyl ester) et à 0,1 g / L (cocaéthylène, cocaéthylène-d₃, ecgonine·HCl, ecgonine-d₃·HCl, ecgonine méthyl ester, ecgonine méthyl ester-d₃, norcocaïne, norcocaéthylène·HCl) sont fournis par Promochem.

La préparation de mélanges partiels se fait extemporanément. Les produits de référence de concentration 1 g / L sont utilisés pour préparer des solutions de 100 mg / L, par dilution dans le solvant approprié (méthanol ou acétonitrile). Ces solutions sont ensuite prises pour la réalisation des mélanges partiels. Le mélange partiel dans l'acétonitrile contient six métabolites (cocaïne, norcocaïne, cocaéthylène, norcocaéthylène, ecgonine méthyl ester et ecgonine éthyl ester). Leur concentration respective dans le mélange final est de 16,67 mg / L. Le mélange partiel dans le méthanol contient quatre métabolites (ecgonine, benzoylecgonine, norbenzoylecgonine et méta-hydroxy-benzoylecgonine). Leur concentration respective dans le mélange final est de 25 mg / L.

Concernant les analogues deutérés, les solutions à 1 g / L sont ramenées à 100 mg / L par dilution dans le solvant approprié.

I.1.2. AUTRES PRODUITS ET SOLUTIONS

Le tampon Krebs-Henseleit-bicarbonate de sodium (120 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 1,2 mM KH₂PO₄, 1,2 mM MgSO₄, 24 mM NaHCO₃) est ajusté à pH 7,4 par HCl 5 N. Ce tampon sera utilisé comme milieu de suspension des hépatocytes isolés de rat.

NaCl est fourni par Prolabo. KCl, KH₂PO₄, MgSO₄·7H₂O et NaHCO₃ sont produits par Sigma.

La solution aqueuse de pH 3,0 est préparée le jour même à partir d'eau désionisée, ajustée à pH 3,0 par une solution HCl 1 N.

Le solvant d'élution (méthanol contenant 3 % d'ammoniaque 25 %) est préparé extemporanément.

Chapitre IV. Choix et mise au point de la méthode d'extraction / dérivatisation de la cocaïne, du cocaéthylène et de huit de leurs métabolites respectifs

Tous les solvants organiques de qualité analytique (acétonitrile, éthanol, méthanol, acide chlorhydrique 30 %, ammoniacque 25 %) sont fournis par Merck.

Le mélange mixte de dérivatisation est préparé dans les proportions respectives [MSTFA : TMCS : TMSI] [100 : 5 : 2 ; v : v : v].

Le N-méthyl-N-triméthylsilyltrifluoroacétamide (MSTFA), le N-*tert*-butyldiméthylsilyl-N-méthyltrifluoroacétamide (MTBSTFA) et le N-*tert*-butylsilyltrifluoroacétamide (BSTFA) contenant 1 % TMCS sont fournis par Pierce. Le triméthylchlorosilane (TMCS) et le 1-(triméthylsilyl)-imidazole (TMSI) proviennent de chez Fluka.

I.2. MATERIEL

Les colonnes d'extraction phase solide (EPS) sont des cartouches Bond Elut LRC Certify[®] avec un volume de réservoir de 10 mL et une masse de phase adsorbante de 130 mg. Le premier type de colonnes ne contient qu'une phase échangeuse de cations (SCX). Le deuxième type de colonnes contient une phase apolaire (C8) et une phase échangeuse de cations (SCX). Elles sont fournies par Varian.

Ces colonnes se positionnent sur un Vac Elut[™] provenant de chez Varian.

Les tubes Pyrex sont fournis par Corning.

Les vials et microvials proviennent de chez Interchim.

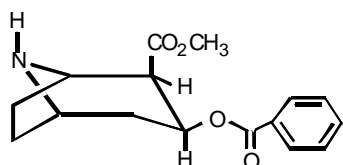
II. DEFINITION DU MODE D'EXTRACTION

Dix molécules dont les propriétés physicochimiques sont présentées dans le Tableau 2 sont à extraire. Ces molécules contiennent des groupes amine, carboxyle et hydroxyle.

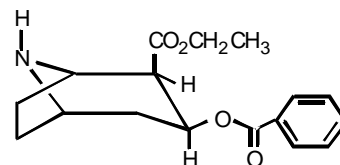
La benzoylecgonine présente une particularité dans le sens où elle possède deux groupes ionisables (une fonction amine tertiaire avec un pK de 8,6 et une fonction acide avec un pK de

Chapitre IV. Choix et mise au point de la méthode d'extraction / dérivatisation de la cocaïne, du cocaéthylène et de huit de leurs métabolites respectifs

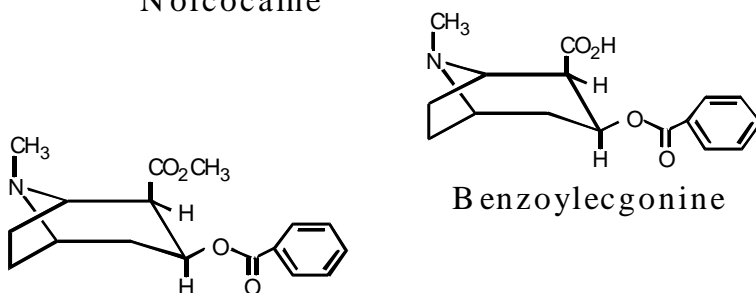
4,0). A pH < 4,0, l'amine est protonée ; à pH > 8,6, l'acide est ionisé. Entre pH 4,0 et 8,6, elle forme un sel interne. Ainsi la molécule est toujours chargée et difficilement extractible par voie lipophile.



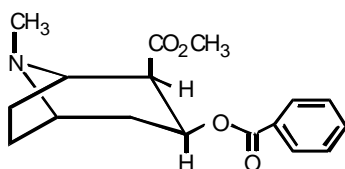
Norcocaine



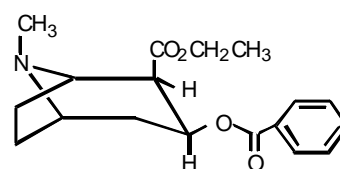
Norcocaéthylène



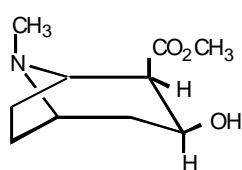
Benzoylecgonine



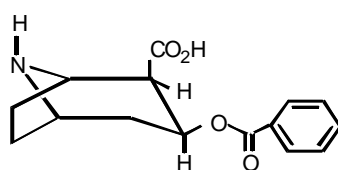
Cocaine



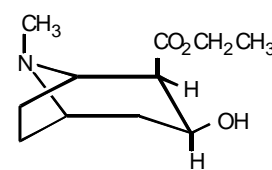
Cocaéthylène



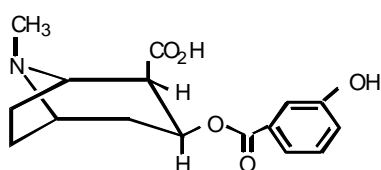
Ecgonine méthyl ester



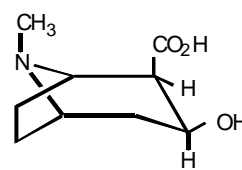
Norbenzoylecgonine



Ecgonine éthyl ester



m-hydroxy-benzoylecgonine



Ecgonine

Tableau 2. Formules des molécules à extraire.

Les propriétés physicochimiques du milieu d'incubation (tampon Krebs-Henseleit-bicarbonate de sodium pH 7,4) et des dix molécules à isoler sont comparées aux conditions requises par une procédure d'extraction afin d'en définir le type (extraction liquide-liquide ou extraction phase solide).

Une extraction liquide-liquide classique par un mélange [IPrOH : CH₂Cl₂] [20 : 80 ; v : v] est suivie d'une dérivatisation par le BSTFA contenant 1 % TMCS à 65°C pendant 30 minutes. L'analyse s'effectue par CPG / SM. Cette procédure, répétée trois fois, ne permet pas d'isoler la benzoylecgonine, l'ecgonine, les trois dérivés N-déméthylés et la méta-hydroxy-benzoylecgonine.

En conclusion, nous avons opté pour une extraction phase solide.

III. SELECTION DE LA PHASE ADSORBANTE

Selon les propriétés physicochimiques des molécules à isoler, la phase adsorbante peut retenir les molécules d'intérêt grâce à trois classes d'interaction : des interactions non polaires, polaires et par échange ionique.

Les interactions non polaires se produisent entre les liaisons carbone-hydrogène des groupes greffés et celles des molécules. Ces interactions sont plus connues sous le nom de forces de Van Der Waals ou encore forces de dispersion. Les interactions polaires se créent entre les groupes hydroxyle de la silice, les fonctions hydroxyle, amine, carbonyle et les groupes contenant des hétéroatomes comme l'oxygène et l'azote. Ces interactions polaires incluent entre autres les ponts hydrogène, les interactions dipole / dipole et les dipôles induits. La troisième classe d'interactions est ionique.

Deux phases d'adsorption sont testées : une phase SCX et une phase C8-SCX.

Les propriétés de ces deux phases sont les suivantes :

-Phase SCX

Groupe fonctionnel : propyl benzène sulfonate.

Interactions primaires : non polaires et échange cationique.

Interactions secondaires : polaires.

-Phase C8

Groupe fonctionnel : octyl.

Interactions primaires : non polaires.

Interactions secondaires : polaires.

-Silice

Les interactions avec les groupes silanol résiduels dans les deux phases sont également à prendre en considération.

Groupe fonctionnel : groupes silanol.

Interactions primaires : polaires et acides.

La phase C8 présente des propriétés similaires à la phase C18. Elle ne retient cependant pas aussi fortement les composés non polaires, ceci étant dû à une chaîne carbonée plus courte. Pour cette raison, C8 est un bon remplacement de C18 pour des molécules d'intérêt trop fortement retenues par cette dernière. Le potentiel de C8 en terme d'interactions polaires est plus fort que le potentiel C18 : la chaîne carbonée plus courte ne masque pas les groupes silanol. Cependant, les interactions polaires ne constituent pas une propriété significative de C8.

Le pKa du groupe fonctionnel propyl benzène sulfonate de la phase SCX est voisin de 2,0.

Nos résultats exposés dans le Tableau 3 montrent que les meilleurs rendements d'extraction sont obtenus avec une phase adsorbante C8-SCX. Le pH de l'échantillon est fixé à 3,0.

Chapitre IV. Choix et mise au point de la méthode d'extraction / dérivatisation de la cocaïne, du cocaéthylène et de huit de leurs métabolites respectifs

MOLECULES	RENDEMENTS D'EXTRACTION (%)	
	Phase SCX	Phase C8-SCX
Ecgonine méthyl ester	79	102
Ecgonine éthyl ester	58	81
Ecgonine	12	47
Cocaïne	86	95
Cocaéthylène	74	80
Benzoylecgonine	85	101
Norcocaïne	-	70
Norcocaéthylène	-	71
Norbenzoylecgonine	-	51
m-hydroxy-benzoylecgonine	54	84

Tableau 3. Rendements d'extraction obtenus avec des phases adsorbantes SCX et C8-SCX.

Une cartouche d'extraction phase solide C8-SCX est présentée à la Figure 5.

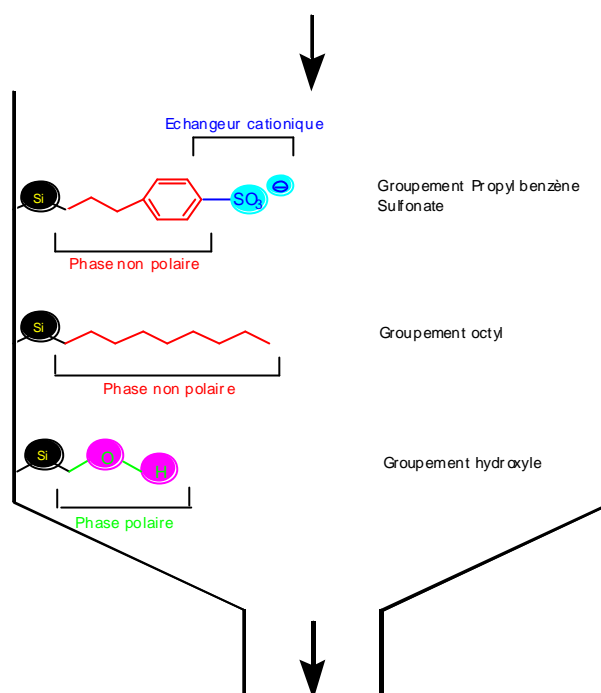


Figure 5. Schéma d'une cartouche d'extraction phase solide C8-SCX.

Les groupes polaires, non polaires et les ions échangeurs sont représentés à pH 3,0.

IV. OPTIMISATION DES CONDITIONS D'EXTRACTION SUR LA PHASE ADSORBANTE C8-SCX

La phase adsorbante sélectionnée est testée pour la rétention, l'élution, la capacité et la sélectivité relative de l'échantillon appliqué.

En pratique, trois étapes sont impliquées dans ce processus expérimental.

IV.1. CHOIX DU pH DE L'ÉCHANTILLON

Chapitre IV. Choix et mise au point de la méthode d'extraction / dérivatisation de la cocaïne, du cocaéthylène et de huit de leurs métabolites respectifs

Les résultats concernant les rendements d'extraction obtenus à trois pH différents sur les cinq testés (pH 1,0 ; 2,0 ; 3,0 ; 4,0 et 5,0) sont représentés dans le Tableau 4.

Ces tests sont réalisés avec des prises d'essais de 1 mL de tampon Krebs-Henseleit-bicarbonate de sodium pH 7,4 surchargées par 1 µg de chacune des dix molécules. Les standards deutérés (200 ng), soit la cocaïne-d₃, le cocaéthylène-d₃, l'ecgonine méthyl ester-d₃, la benzoylecgonine-d₃ et l'ecgonine-d₃ sont ajoutés après l'extraction.

La dérivatisation par le mélange [MSTFA : TMCS : TMSI] [100 : 5 : 2 ; v : v : v] se déroule à 65°C pendant 30 minutes.

MOLECULES	Rendements (%)	Rendements (%)	Rendements (%)
	à pH = 1,0	à pH = 3,0	à pH = 5,0
Ecgonine méthyl ester	37,9	39,3	50,9
Ecgonine éthyl ester	24,2	21,9	24,8
Ecgonine	20,0	29,8	12,5
Cocaïne	91,5	92,3	91,5
Cocaéthylène	93,0	82,5	90,5
Benzoylecgonine	115	98,8	89,0
Norcocaïne	142	123	82,3
Norcocaéthylène	62,6	55,4	24,6
Norbenzoylecgonine	72,0	69,3	42,9
m-hydroxy-benzoylecgonine	78,5	68,7	66,1

Tableau 4. Rendements d'extraction à trois pH différents.

Le groupe de Peterson [Peterson, 1995] a isolé l'ecgonine à pH 2-2,5. Selon nos résultats exposés dans le Tableau 4, c'est un pH de 3,0 qui permet les meilleurs rendements, en particulier pour l'ecgonine. Il est à noter que cette valeur est proche de celle du pKa de l'ecgonine.

En conclusion, le pH de l'échantillon est fixé à 3,0.

La phase adsorbante doit être activée par la même solution de dilution de l'échantillon. Plus particulièrement, le groupement propyl benzène sulfonate est activé par une solution

aqueuse ajustée à pH 3,0 par HCl 1 N. Nos résultats antérieurs avaient montré qu'une activation par une solution aqueuse ramenée au même pH par H₃PO₄ 0,2 N ne permettait pas d'extraire l'ecgonine.

En conclusion, la phase adsorbante C8-SCX est conditionnée en deux étapes selon :

- Lavage par 2 mL de méthanol.
- Ne pas sécher la colonne.
- Activation par 2 mL HCl pH 3,0.
- Ne pas sécher la colonne.

IV.2. CHOIX DES SOLVANTS DE LAVAGE

Les solvants de lavage sont choisis pour éliminer le maximum d'interférences tandis que les molécules d'intérêt ne doivent pas être éluées.

Ces tests sont réalisés avec des prises d'essais de 1 mL de tampon Krebs-Henseleit-bicarbonate de sodium pH 7,4 surchargées par 1 µg de chacune des dix molécules. Les cinq standards deutérés (200 ng) sont ajoutés après l'extraction.

La dérivatisation par le mélange [MSTFA : TMCS : TMSI] [100 : 5 : 2 ; v : v : v] se déroule à 65°C pendant 30 minutes.

Nous avons comparé quatre types de lavage :

- Lavage 1 : -5 mL d'eau acidifiée pH 3,0.
 - Sécher la phase sous vide pendant 1 minute.
 - 2 mL HCl 0,1 N.
 - Sécher la phase sous vide pendant 1 minute.
 - 1 mL d'eau contenant 5 % d'acétonitrile.
- Lavage 2 : -5 mL d'eau acidifiée pH 3,0.
 - Sécher la phase sous vide pendant 1 minute.
 - 2 mL HCl 0,1 N.
 - Sécher la phase sous vide pendant 1 minute.
 - 1 mL d'eau contenant 5 % de méthanol.
- Lavage 3 : -5 mL d'eau acidifiée pH 3,0.

- Sécher la phase sous vide pendant 1 minute.
- 2 mL HCl 0,1 N.
- Sécher la phase sous vide pendant 1 minute.
- 1 mL de n-hexane.

-Lavage 4 : -5 mL d'eau acidifiée pH 3,0.

- Sécher la phase sous vide pendant 1 minute.
- 2 mL HCl 0,1 N.
- Sécher la phase sous vide pendant 1 minute.
- 1 mL de méthanol.

Nous avons vérifié que le méthanol ne décrochait pas les molécules d'intérêt.

L'étape de lavage est définie de façon à allier propreté des extraits et meilleurs rendements possibles. Ces derniers sont compris entre 31,4 % (méta-hydroxy-benzoylécgonine) et 111 % (benzoylécgonine) lorsque le lavage 4 est appliqué.

En conclusion, le lavage de la phase solide C8-SCX s'effectue en trois étapes, par passages successifs de :

- 5 mL d'eau acidifiée pH 3,0.
- 2 mL HCl 0,1 N.
- 1 mL de méthanol.

IV.3. CHOIX DES SOLVANTS D'ELUTION

Dans le choix des solvants d'élution, trois objectifs sont à considérer :

- Le volume d'élution doit être le plus petit possible.
- Les meilleurs solvants d'élution sont sélectifs : ils présentent un potentiel maximal d'élution des molécules d'intérêt tandis que les interférences doivent être retenues.
- Les molécules d'intérêt sont généralement hautement solubles dans les solvants d'élution.

Deux solvants d'élution couramment cités dans la littérature sont testés :

- 3 x 1 mL de méthanol contenant 3 % d'ammoniaque 25 %.
- 3 x 1 mL d'un mélange [IPrOH : CH₂Cl₂] [20 : 80 ; v : v] contenant 3 % d'ammoniaque 25 %.

Une élution par un mélange [IPrOH : CH₂Cl₂] [20 : 80 ; v : v] contenant 3 % d'ammoniaque 25 % donne des résultats décevants. La plupart des molécules ne sont pas ou très mal éluées.

Notre choix s'est donc porté sur une élution par du méthanol (3 x 1 mL) contenant 3 % d'ammoniaque 25 %.

V. CHOIX DE L'AGENT DE DERIVATISATION

Lors d'une dérivation, les groupements fonctionnels polaires d'une molécule sont remplacés par des groupements de réactivité appropriée grâce à une réaction chimique quantitative, rapide et reproductible. La dérivation d'une substance polaire signifie une réduction de sa polarité, une augmentation de sa volatilité ainsi qu'une augmentation de sa stabilité thermique. La dérivation peut modifier le mode de fragmentation d'une substance par spectrométrie de masse.

Plusieurs types de dérivation sont possibles parmi lesquels l'acétylation et la silylation. Il existe un nombre important d'agents de silylation ainsi que de types de dérivés silylés [Simchen, 1995].

Certains métabolites de la cocaïne de polarités variables nécessitent une dérivation.

Les agents de dérivation de type BSTFA ; BSTFA, 1 % TMCS et MTBSTFA que nous avons testés ne permettent qu'une silylation incomplète des métabolites N-déméthylés, en particulier de la norcocaïne.

En conclusion, le réactif retenu est le MSTFA dont le pouvoir de silylation est renforcé par deux catalyseurs (TMCS et TMSI).

La méthode de dérivation utilisée est la suivante. L'évaporation du solvant d'élution se fait sous azote, à température ambiante. L'extrait sec est repris par 500 µL d'éthanol puis de nouveau évaporé. A l'extrait évaporé de l'échantillon sont ajoutés 30 µL du mélange [MSTFA : TMCS : TMSI] [100 : 5 : 2 ; v : v : v]. La réaction se déroule à 65°C pendant 30 minutes. Cette dérivation permet un rendement de 100 % : aucune molécule d'intérêt non dérivée n'apparaît sur le chromatogramme.

VI. CONCLUSION

Notre méthode d'extraction phase solide, schématisée ci-après (Figure 6), permet d'isoler simultanément la cocaïne, le cocaéthylène et huit de leurs métabolites respectifs dans du tampon Krebs-Henseleit-bicarbonate de sodium pH 7,4.

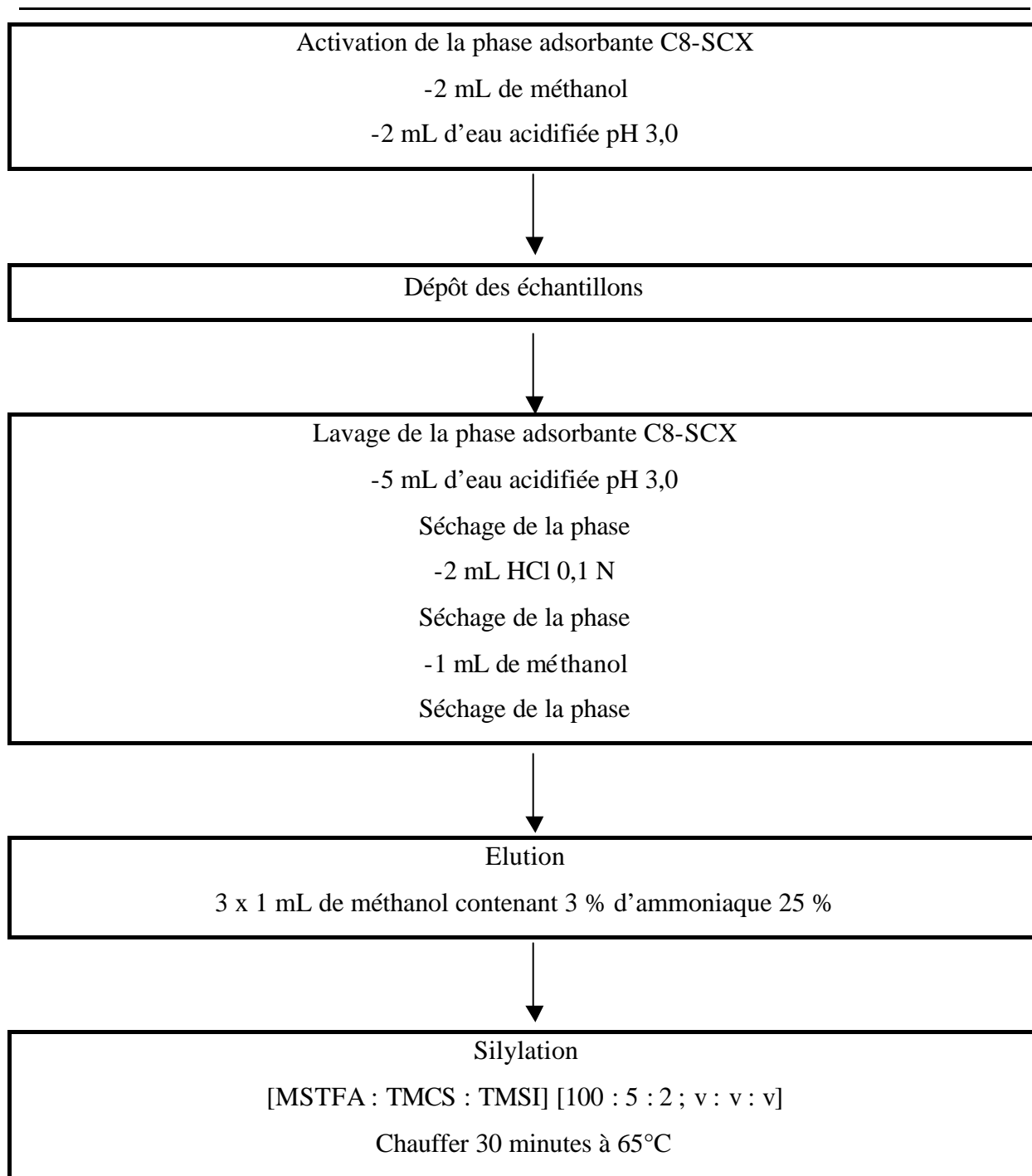


Figure 6. Schématisation de la méthode d'extraction phase solide.

CHAPITRE V. CHOIX ET MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE ANALYTIQUE PAR CHROMATOGRAPHIE PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE

I. NOTION THEORIQUE ET APPAREILLAGE	46
I.1. PRINCIPE PHYSIQUE	47
I.2. DIFFERENTES FONCTIONS	47
I.2.1. LA SOURCE D'IONS OU CHAMBRE D'IONISATION	47
I.2.2. L'ANALYSEUR : SEPARATION ET DISPERSION DES MASSES	48
I.2.3. LE DETECTEUR	48
I.2.4. L'INTERFACE	48
II. MODE D'INTRODUCTION ET ANALYSES	49
II.1. COUPLAGE CHROMATOGRAPHIE GAZ-LIQUIDE / SPECTRO- METRIE DE MASSE	49
II.2. ACQUISITION DES DONNEES	49
II.2.1. CHROMATOGRAMME DU COURANT IONIQUE TOTAL	49
II.2.2. FRAGMENTOMETRIE	50
II.2.2.1. ETUDE DES SPECTRES DE MASSE	50
II.2.2.2. REPRESENTATION GRAPHIQUE DES SPECTRES DE MASSE	51
II.3. PARAMETRES D'IDENTIFICATION ET DE QUANTIFICATION	59
II.4. RESUME DES CONDITIONS OPERATOIRES EN CHROMATOGRAPHIE PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE	60

III. TEST AVEC LE MELANGE REACTIONNEL	61
IV. CONCLUSION	62

CHAPITRE V. CHOIX ET MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE ANALYTIQUE PAR CHROMATOGRAPHIE PHASE GAZEUSE COUPLÉE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE

La spectrométrie de masse permet une identification univoque des molécules organiques. Cependant, pour les mélanges complexes, il est nécessaire de la coupler en amont avec une méthode séparative.

I. NOTION THEORIQUE ET APPAREILLAGE

La spectrométrie de masse est une méthode physicochimique d'analyse moléculaire. Sa caractéristique est liée à sa spécificité d'identification, par l'étude du spectre de masse, de la molécule inconnue. En effet, celui-ci est une véritable empreinte digitale, donc propre à chaque molécule.

Pour l'analyse de mélanges complexes, il faut mettre en œuvre, en amont du spectromètre de masse, une méthode séparative : par exemple, la chromatographie gazeuse. Cela définit un couplage chromatographie phase gazeuse / spectrométrie de masse (CPG / SM).

I.1. PRINCIPE PHYSIQUE

Le spectromètre de masse est un appareil qui :

- crée des ions à partir de l'échantillon à analyser,
- sépare ces derniers suivant le rapport m/z (m = masse de l'ion ; z = charge de l'ion),
- donne la répartition et l'intensité relative des différents m/z , permettant ainsi d'obtenir un spectre de masse.

I.2. DIFFERENTES FONCTIONS

L'appareil comprend :

- une source d'ions,
- un analyseur de masse,
- un détecteur du signal,
- une interface électronique-informatique.

L'ensemble source-analyseur, au niveau duquel se créent et se propagent les ions, doit être placé sous un vide poussé (10^{-6} Torr).

I.2.1. LA SOURCE D'IONS OU CHAMBRE D'IONISATION

Il existe deux principaux modes d'ionisation des molécules : l'impact électronique (IE) et l'ionisation chimique (IC).

Notre technique fait appel à l'impact électronique. Dans ce cas, la molécule est bombardée par un flux d'électrons émis par un filament et accélérés. L'énergie des électrons est une donnée standard afin de pouvoir comparer tous les spectres rapportés dans la littérature : elle est de 70 eV. La molécule est cassée en divers fragments ionisés qui sont accélérés et extraits de la chambre par un système de plaques électrostatiques portées à différents potentiels.

I.2.2. L'ANALYSEUR : SEPARATION ET DISPERSION DES MASSES

Il existe trois types d'analyseur : magnétique, à temps de vol et quadripolaire.

Notre appareillage est constitué d'un analyseur quadripolaire. Celui-ci est constitué par un assemblage de quatre électrodes parallèles, de section hyperbolique (dans la pratique, ce sont quatre barres cylindriques en molybdène). Les électrodes adjacentes étant portées à des potentiels opposés, nous faisons varier le potentiel des électrodes en combinant une tension continue et une tension sinusoïdale haute-fréquence. Le champ électrique qui dérive de ce potentiel est appelé champ quadripolaire. Le système agit comme un filtre laissant passer à un moment donné les seuls ions possédant un rapport m/z déterminé.

I.2.3. LE DETECTEUR

Le détecteur est un multiplicateur de photons. Il est constitué de deux dynodes de conversion, d'un écran phosphorescent et du photomultiplicateur. Ce dispositif permet la détection des ions positifs et négatifs. En mode positif, les ions sont accélérés vers la dynode portée à un potentiel négatif alors qu'en mode négatif, les ions sont accélérés vers la dynode positive. Les électrons secondaires émis par ces dynodes de conversion sont alors accélérés vers l'écran phosphorescent où ils sont convertis en photons. Ces photons sont ensuite détectés par le photomultiplicateur. La valeur du gain de conversion est de l'ordre de 10^4 à 10^5 .

I.2.4. L'INTERFACE

Le signal prélevé à la sortie du photomultiplicateur est mesuré par un système numérique d'acquisition des données et de traitement des informations par ordinateur.

II. MODE D'INTRODUCTION ET ANALYSES

II.1. COUPLAGE CHROMATOGRAPHIE PHASE GAZEUSE / SPECTROMETRIE DE MASSE

Le chromatographe et le spectromètre sont placés en série : l'interface entre les deux appareils doit être courte, bien étanche et chauffée.

Nous utilisons des colonnes capillaires en silice fondue, qui outre les avantages liés à leur conception, sont d'une manipulation très aisée. Leur efficacité (nombre de plateaux théoriques) est beaucoup plus grande que celle des colonnes remplies et il est possible d'analyser, avec une bonne séparation, des mélanges très complexes (longueur de 50 m et 150 000 plateaux théoriques).

II.2. ACQUISITION DES DONNEES

II.2.1. CHROMATOGRAMME DU COURANT IONIQUE TOTAL

Lors de l'acquisition des données à partir d'un mélange complexe, les molécules séparées dans la colonne arrivent successivement dans la chambre d'ionisation et sont analysées en continu par le spectromètre qui intègre, à chaque instant, le courant ionique recueilli.

A la fin de la manipulation, l'ordinateur restitue l'ensemble des données sous la forme d'un chromatogramme qui est le profil du courant ionique total (CIT) recueilli au cours du temps.

En tous points de ce chromatogramme, il est possible d'obtenir le spectre de masse, notamment pour chaque pic chromatographique qui correspond à l'élution d'une molécule.

II.2.2. FRAGMENTOMETRIE

L'acquisition des données suivant la méthode SIR (Selected Ion Research) permet de superposer au courant ionique total, le profil ionique constitué d'un à trois ions dont on veut plus particulièrement suivre la détection.

Ces ions sont choisis en fonction de la molécule que l'on cherche à identifier et doivent être spécifiques de celle-ci. Dans notre cas, un ion sert à l'identification de la molécule ; les deux autres permettent une confirmation.

L'utilisation de la méthode SIR présente plusieurs intérêts :

- possibilité de repérer des molécules dans un profil chromatographique très chargé en sélectionnant les ions caractéristiques des produits recherchés,
- possibilité de détecter des traces faibles (quelques nanogrammes injectés) de produit car l'acquisition et la visualisation d'un courant ionique spécifique sont d'une très grande sensibilité,
- possibilité de quantifier un produit en utilisant l'intégration du courant ionique spécifique d'un ion choisi (pas forcément le pic moléculaire) et son temps de rétention. Il suffit alors de déterminer et introduire préalablement, dans le système de traitement, une courbe d'étalonnage du produit à quantifier.

II.2.2.1. ETUDE DES SPECTRES DE MASSE

Après bombardement électronique de la molécule, différents ions positifs sont obtenus.

Ce sont :

- l'ion moléculaire M^{+} ,
- des ions fragments obtenus à partir de l'ion moléculaire,
- des ions isotopiques créant des massifs isotopiques,
- des ions de réarrangement qui mettent en jeu la rupture de plusieurs liaisons avec recombinaison.

La séparation des molécules est obtenue.

II.2.2.2. REPRESENTATION GRAPHIQUE DES SPECTRES DE MASSE

Les spectres de masse (Figure 7), classés par ordre d'apparition sur le chromatogramme, fournissent différents renseignements liés à la présence :

- du pic moléculaire : c'est l'ion de masse le plus élevé repérable et non isotopique. Pour la cocaïne, $m/z = 303$.
- du pic de base : c'est le pic le plus important du spectre qui correspond à l'ion formé quantitativement de façon la plus importante lors de l'ionisation. Pour la cocaïne, $m/z = 182$.
- des ions fragments : ils sont plus ou moins nombreux suivant le degré de fragmentation de l'ion moléculaire.

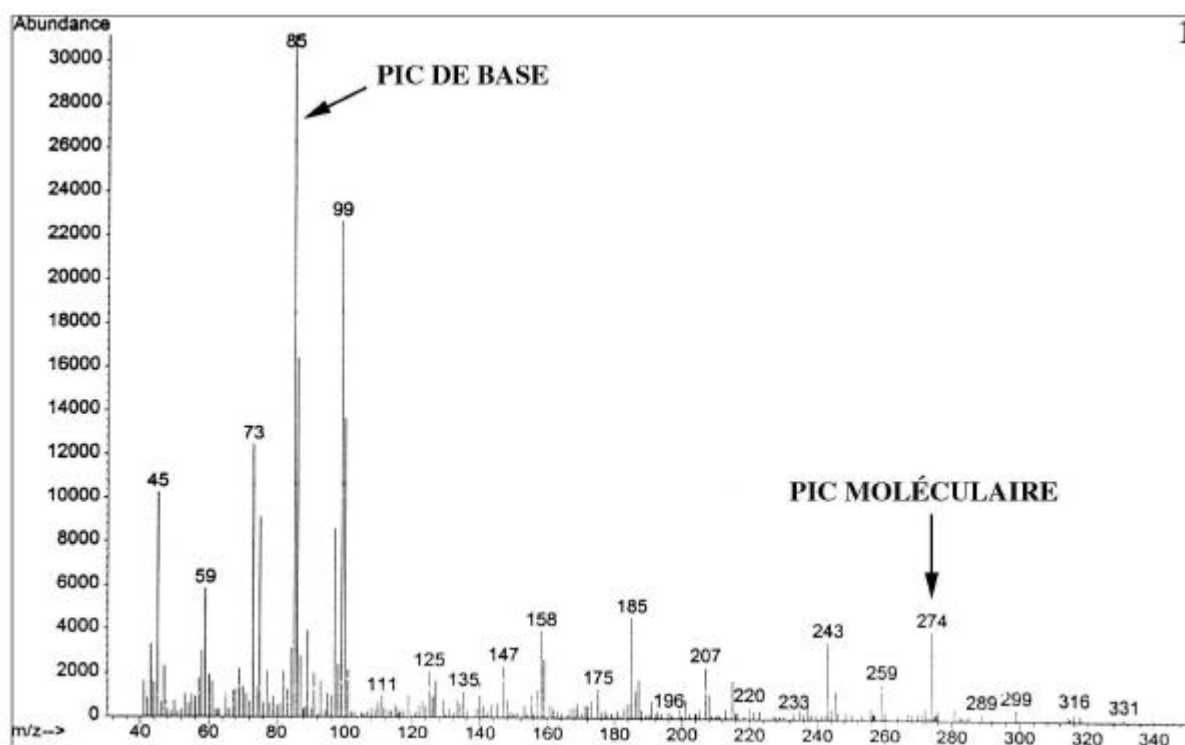


Figure 7a. Ecgonine méthyl ester-d₃-TMS.

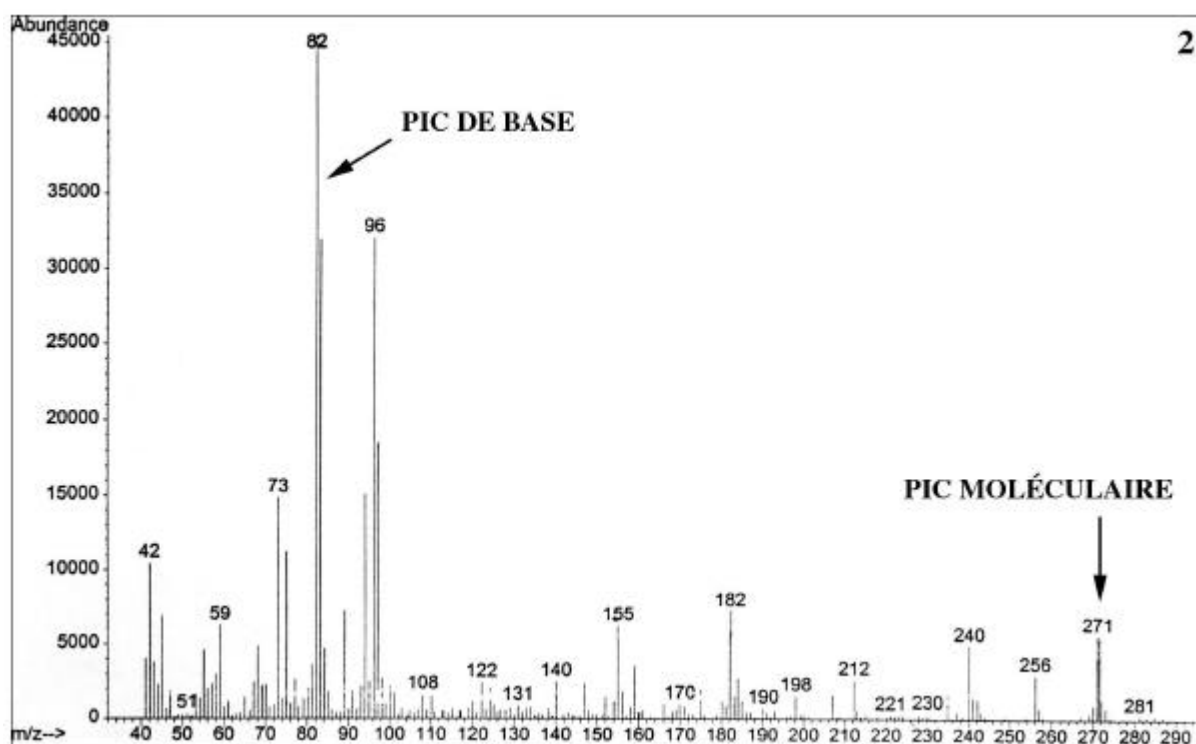


Figure 7b. Ecgonine méthyl ester-TMS.

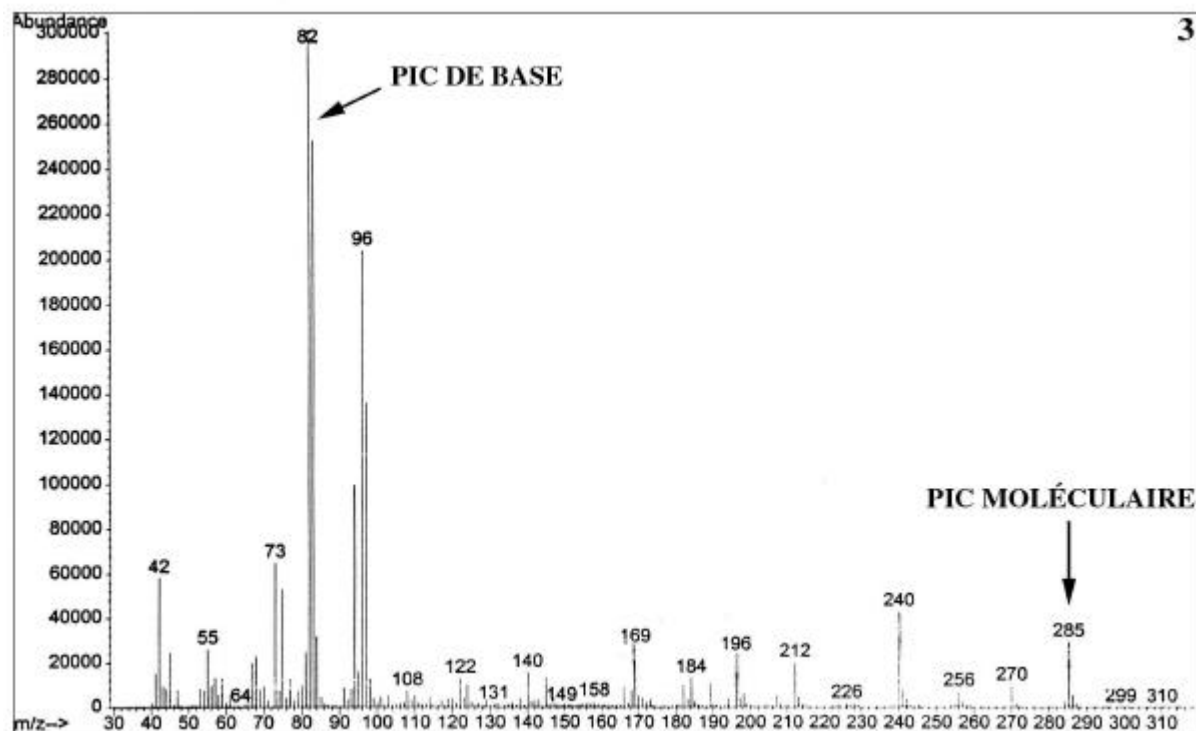


Figure 7c. Ecgonine éthyl ester-TMS.

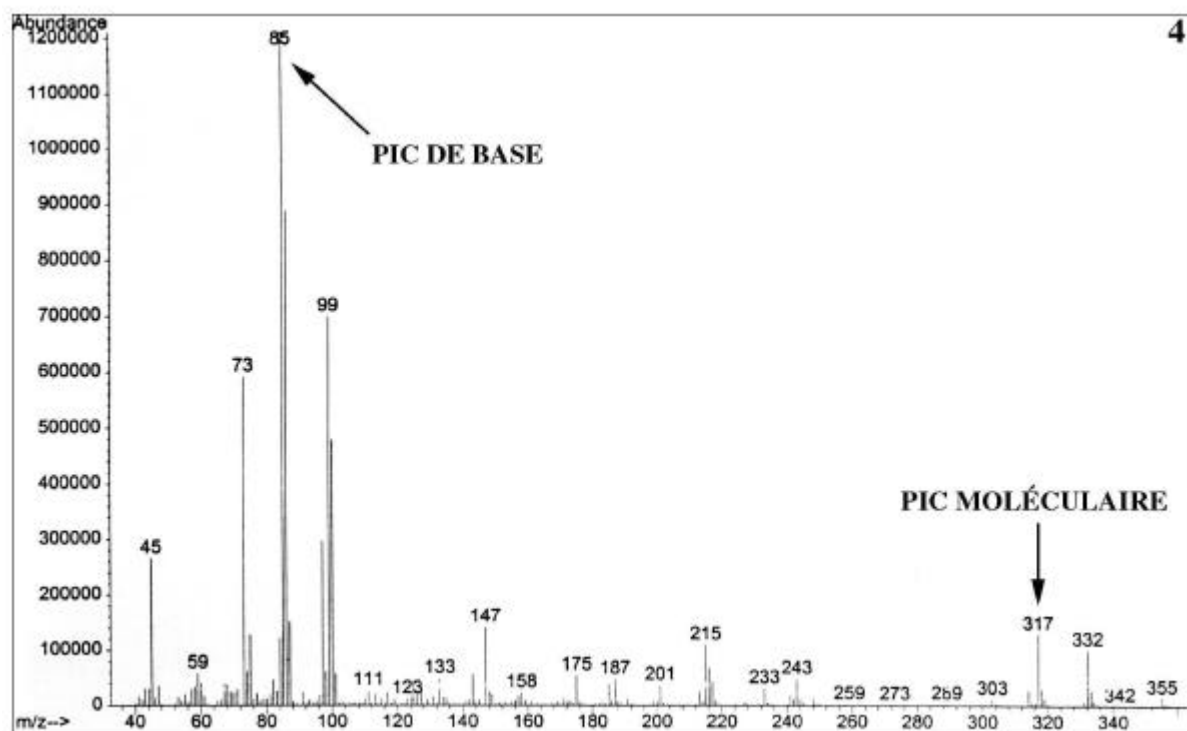


Figure 7d. Ecgonine-d₃-2TMS.

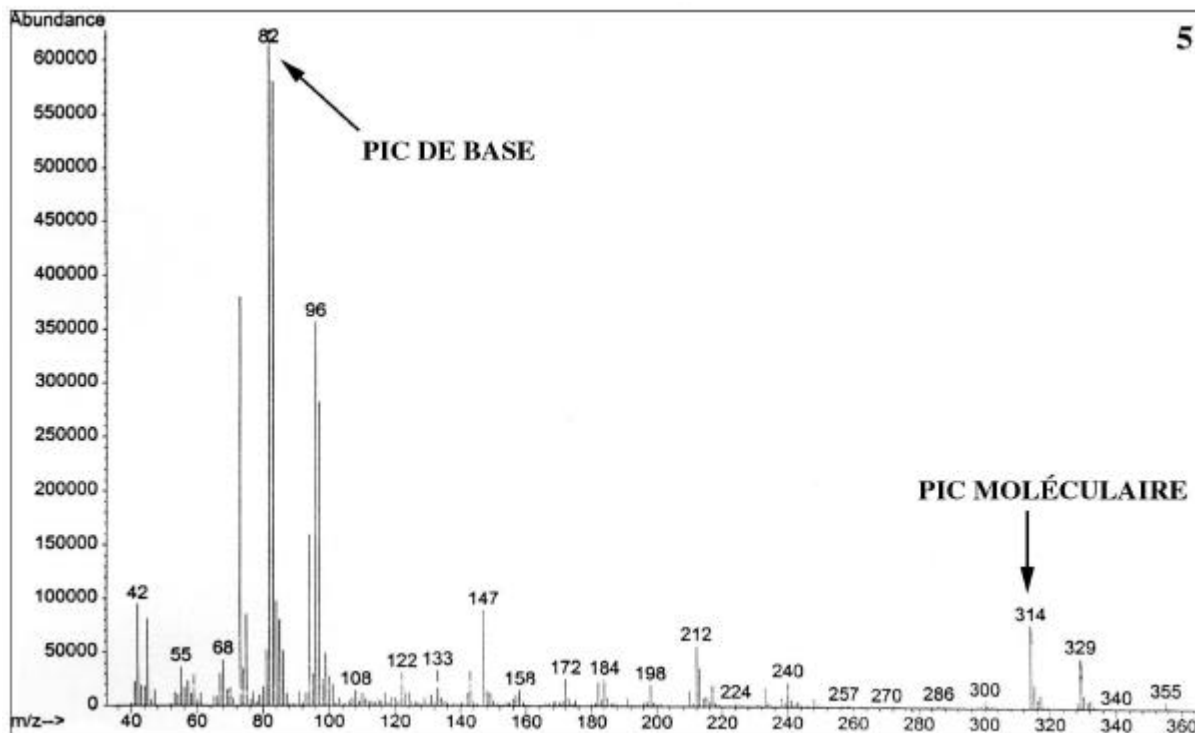


Figure 7e. Ecgonine-2TMS.

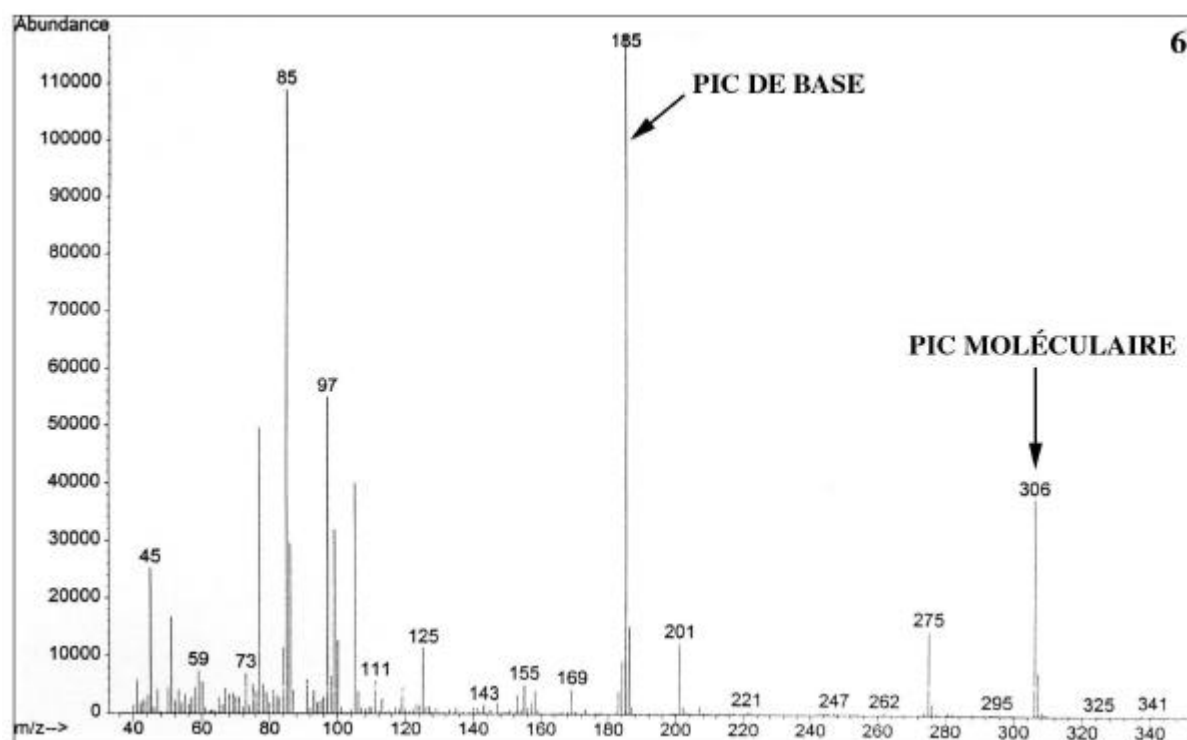


Figure 7f. Cocaïne-d₃.

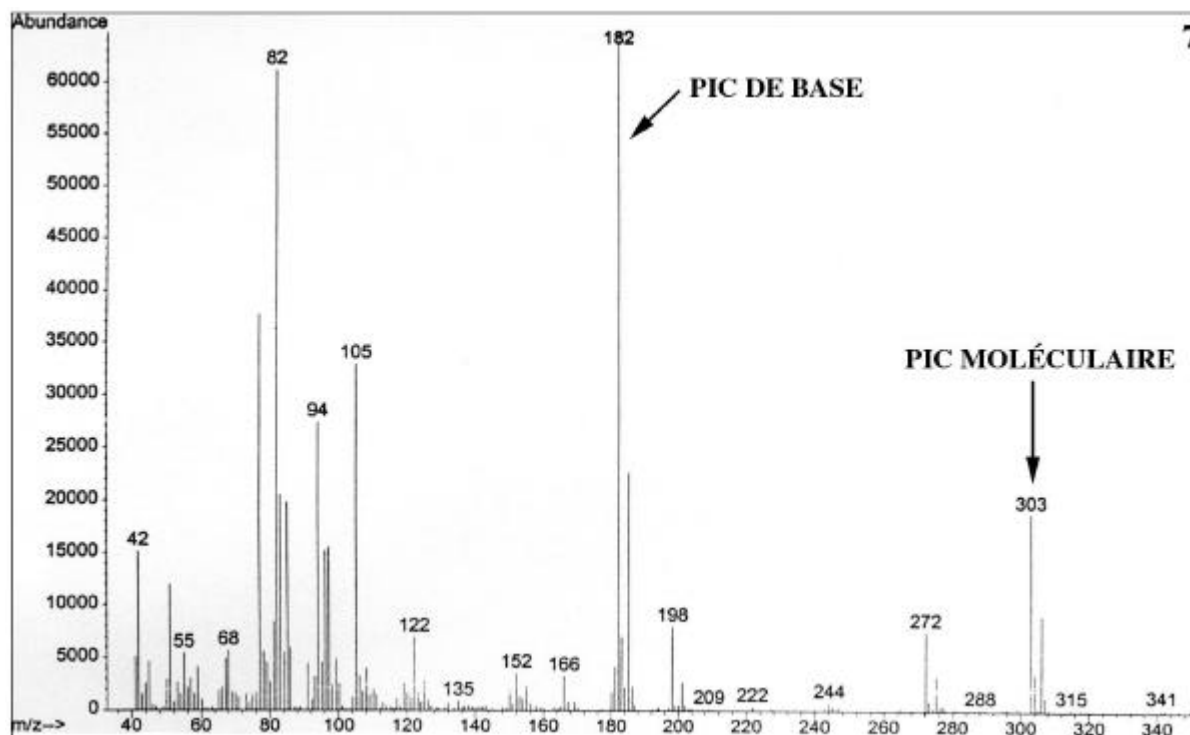


Figure 7g. Cocaïne.

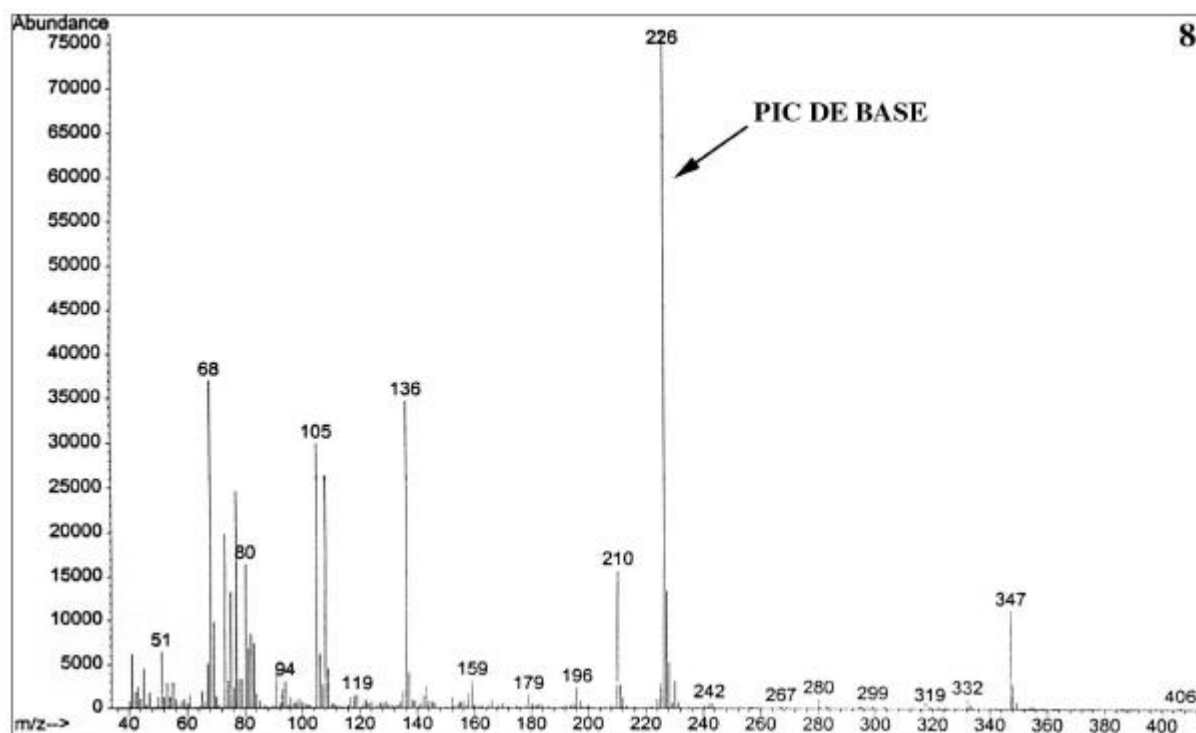


Figure 7h. Norbenzoylecgonine-2TMS.

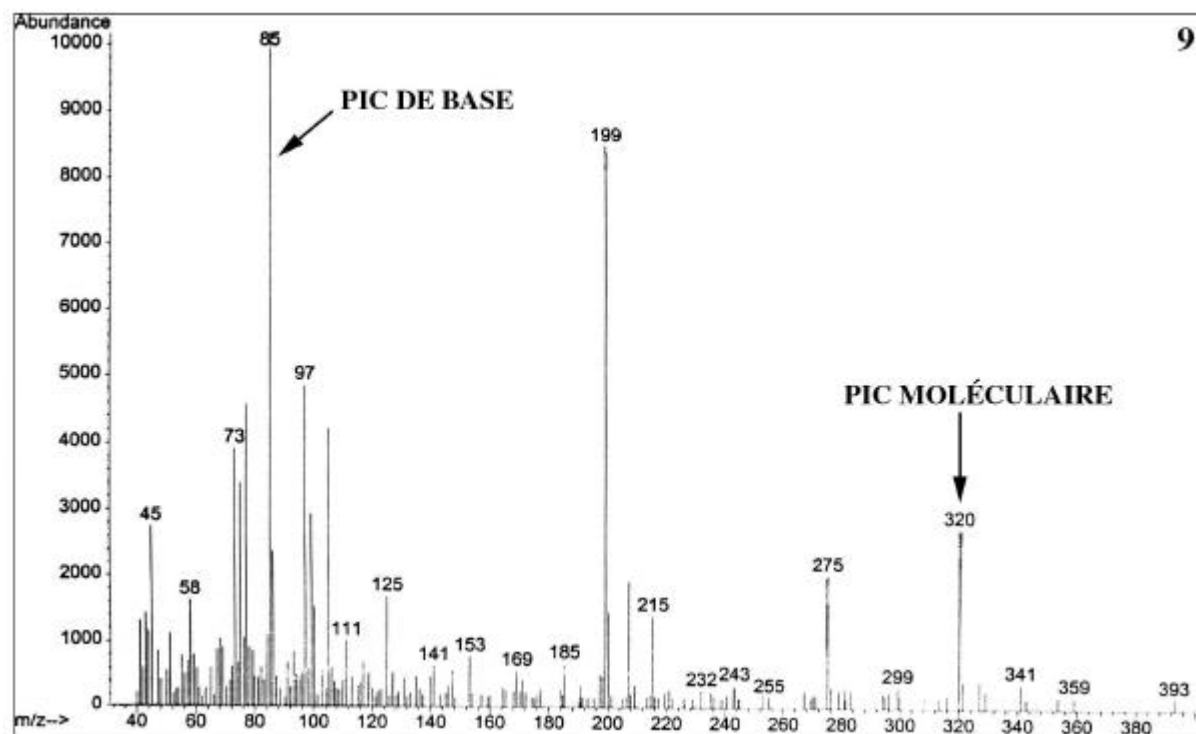


Figure 7i. Cocaéthylène-d₃.

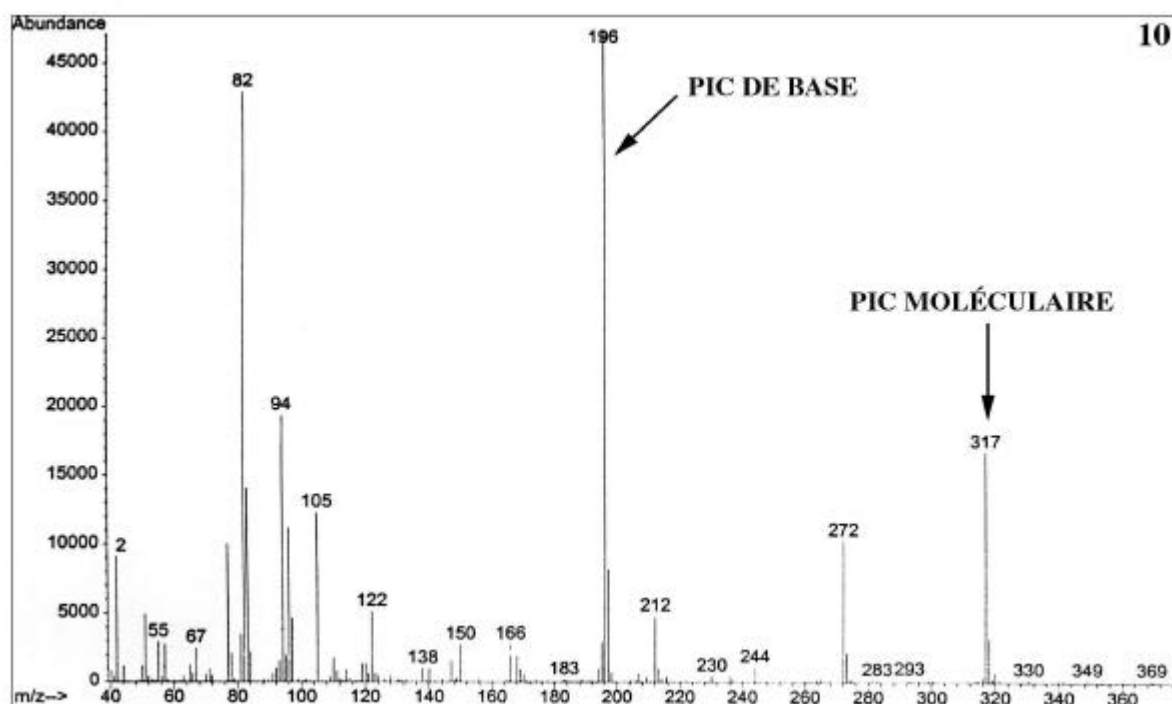


Figure 7j. Cocaéthylène.

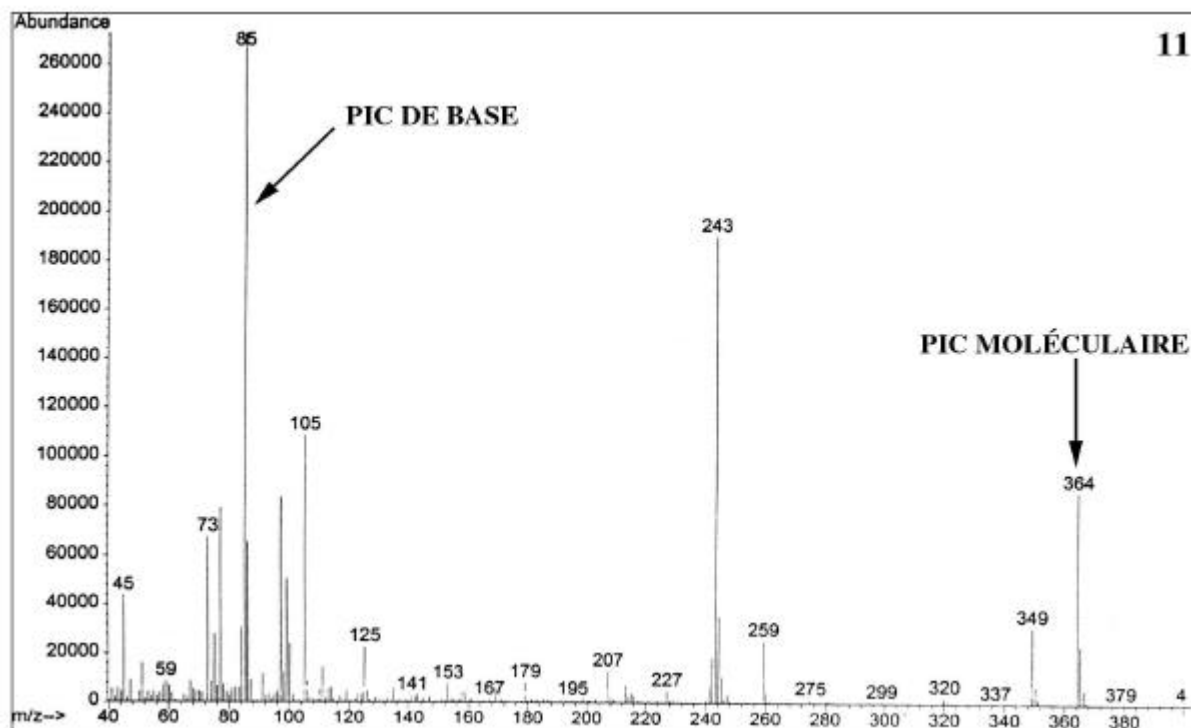


Figure 7k. Benzoylecgonine- d_3 -TMS.

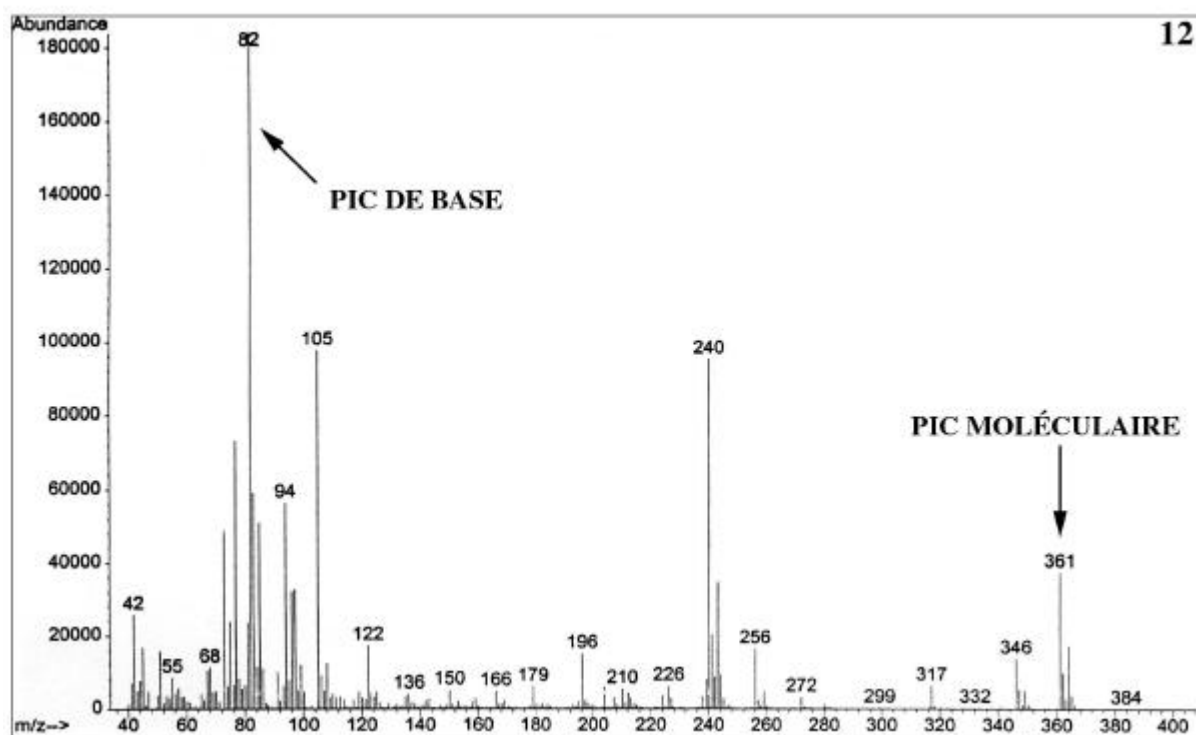


Figure 7l. Benzoyllecgonine-TMS.

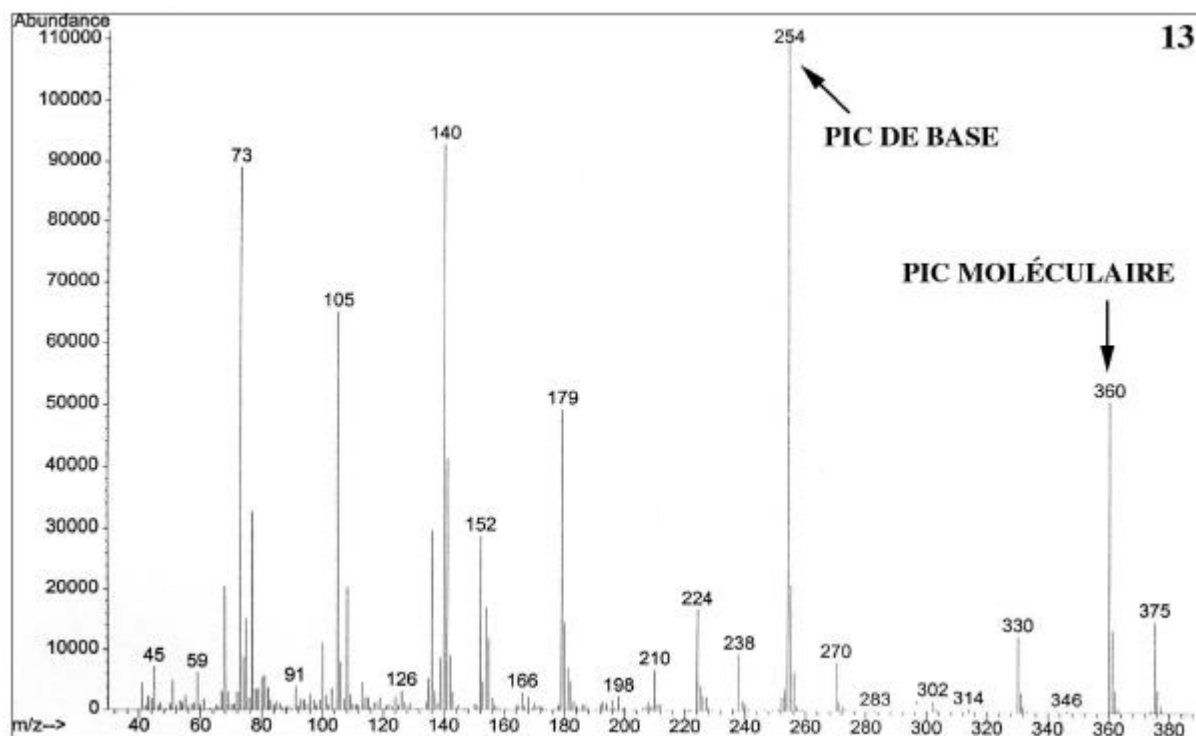


Figure 7m. Norcoéthylène-TMS.

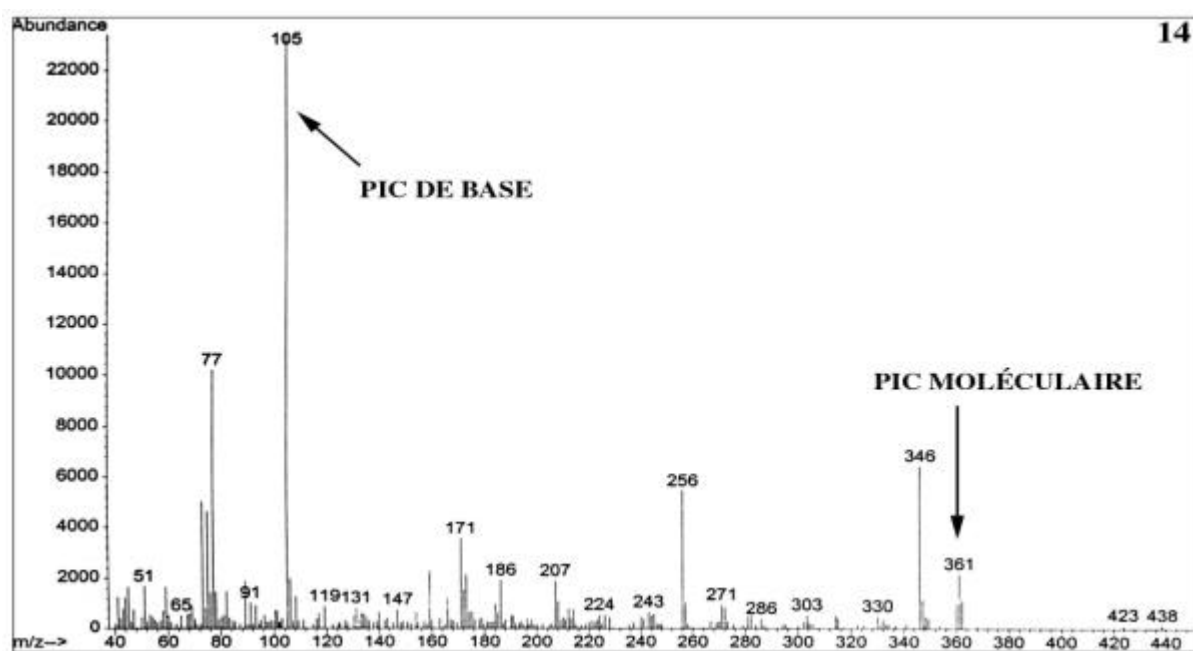


Figure 7n. Norcocaine-TMS.

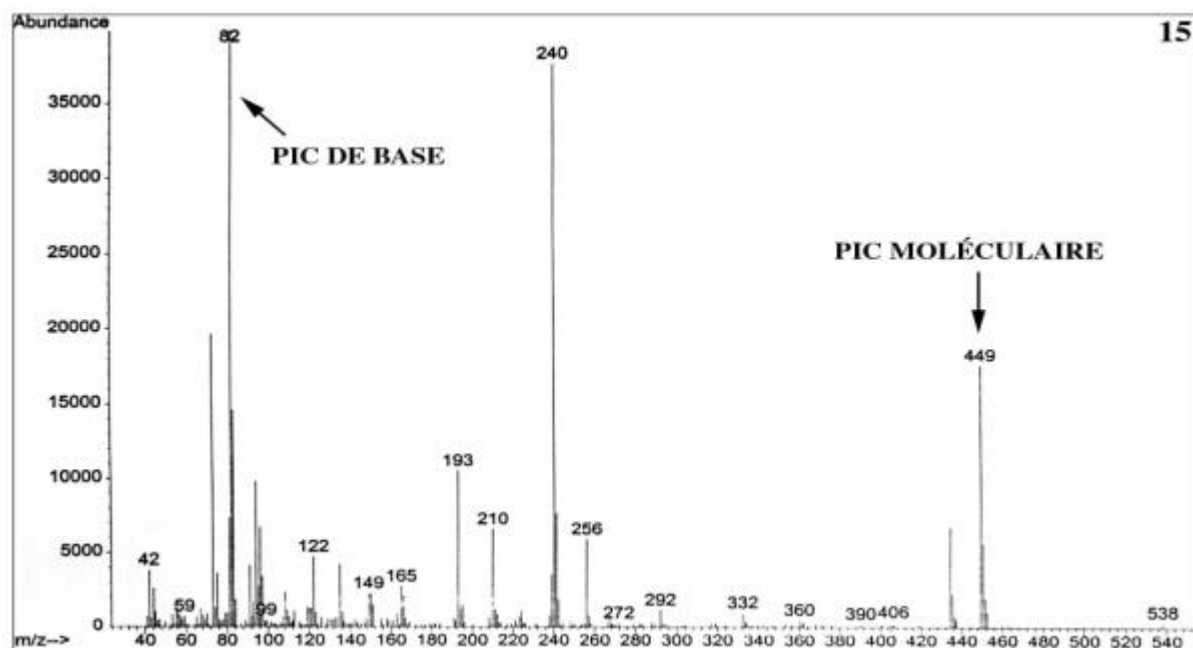


Figure 7o. Méta-hydroxy-benzoyllecgonine-2TMS.

Figure 7. Spectres de masse de la cocaïne, du cocaéthylène et de leurs métabolites respectifs silylés obtenus par CPG / SM.

II.3. PARAMETRES D'IDENTIFICATION ET DE QUANTIFICATION

Les analogues deutérés sont usuellement choisis en tant qu'étalons internes pour l'analyse en spectrométrie de masse. Ici ont été utilisés la cocaïne-d₃, le cocaéthylène-d₃, la benzoylecgonine-d₃, l'ecgonine méthyl ester-d₃ et l'ecgonine-d₃. Les autres molécules dont les équivalents deutérés ne sont pas commercialisés sont quantifiées par rapport aux cinq molécules-d₃ citées précédemment, celles-ci étant choisies en fonction de leur analogie structurale.

Les paramètres d'identification et de quantification sont exposés dans le Tableau 5.

MOLECULES	Temps de rétention (minute)	Ions de quantification	Ions qualifiants	Etalons internes deutérés et ions de quantification
Ecgonine méthyl ester	8,04	181,98	95,91 ; 240,06	EME-d ₃ (184,98)
Ecgonine éthyl ester	8,53	240,06	95,91 ; 285,06	EME-d ₃ (184,98)
Ecgonine	8,72	95,91	212,01 ; 314,08	E-d ₃ (98,91)
Cocaïne	13,17	181,98	81,83 ; 303,03	COC-d ₃ (184,98)
Norbenzoylecgonine	13,55	298,10	104,91 ; 404,10	BE-d ₃ (243,06)
Cocaéthylène	13,62	195,97	81,83 ; 317,08	CE-d ₃ (198,97)
Benzoylecgonine	14,05	240,06	81,83 ; 361,14	BE-d ₃ (243,06)
Norcocaéthylène	14,26	254,05	104,91 ; 360,08	CE-d ₃ (198,97)
Norcocaïne	14,32	104,91	139,98 ; 346,03	COC-d ₃ (184,98)
m-hydroxy -benzoylecgonine	15,51	240,06	434,11 ; 449,12	BE-d ₃ (243,06)

Tableau 5. Paramètres d'identification et de quantification des molécules.

L'ion de quantification est l'ion moléculaire lorsque celui-ci est le plus abondant. Les deux ions qualifiants sont deux fragments d'abondance élevée sauf pour l'ecgonine méthyl ester.

Le rapport des abondances relatives permet de vérifier qu'il s'agit de la bonne molécule.

II.4. RESUME DES CONDITIONS OPERATOIRES EN CHROMATOGRAPHIE PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE

Les conditions opératoires en CPG / SM sont résumés dans le Tableau 6.

Marque	Fisons MD 800
CG	CG 8000
Injecteur	Splitless : 45 secondes
Température de l'injecteur	250°C
Colonne	JW DB5 MS (longueur = 15 m ; diamètre interne = 0,25 mm ; épaisseur du film = 0,25 µm)
Gaz vecteur	He (1 mL / min)
Programme de température	100°C (1 min) à 280°C (8°C / min) (5 min)
Température de l'interface	280°C
Détecteur de masse	MD 800
Mode d'ionisation	IE à 70 eV
Température de la source	200°C
Analyseur	Quadripolaire
Mode d'acquisition	Scan ou SIR
Intervalle de masses balayées	40 à 550 uma
Injecteur automatique	AS 800
Volume injecté	1 µL
Logiciel de traitement	MassLab

Tableau 6. Paramètres utilisés en CPG / SM.

III. TEST AVEC LE MELANGE REACTIONNEL

L'interférence éventuelle des composés du mélange réactionnel avec les molécules d'intérêt est identifiée par le biais d'un test.

Ce mélange réactionnel sera utilisé pour les hépatocytes isolés de rat. Celui-ci est du tampon Krebs-Henseleit-bicarbonate de sodium pH 7,4 (1 mL) acidifié par 75 μ L HClO₄ 40 %. Le pH est ramené à 3,0 par NaOH 5 N (30 μ L) et 1 N (70 μ L).

Le mélange réactionnel surchargé par les dix molécules (1000 ng) et les cinq standards deutérés (200 ng) subit les processus d'extraction et analyse décrits précédemment. L'expérience est répétée trois fois.

Le profil d'élution obtenu par CPG / SM est représenté sur la Figure 8.

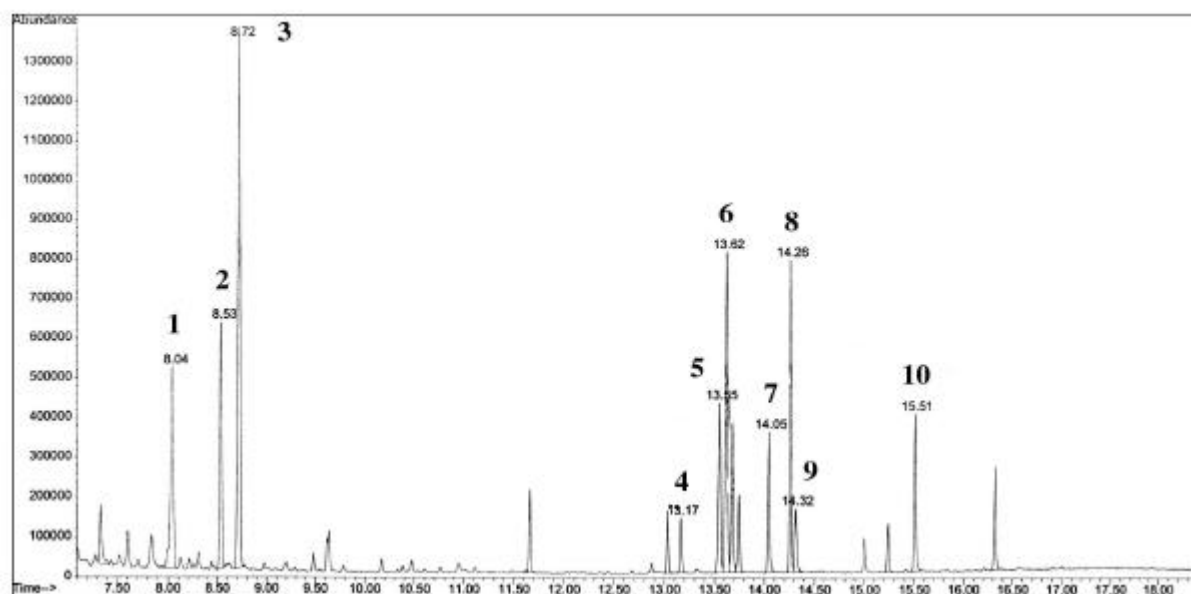


Figure 8. Profil chromatographique reconstitué obtenu par CPG / SM à partir d'un échantillon de tampon Krebs-Henseleit-bicarbonate de sodium pH 7,4 surchargé en molécules d'intérêt et étalons deutérés.

Le courant ionique total est reconstitué en mode impact électronique, avec un balayage m/z de 40 à 550 uma.

1 : Ecgonine méthyl ester-TMS ; 2 : Ecgonine éthyl ester-TMS ; 3 : Ecgonine-2TMS ; 4 : Cocaïne ; 5 : Norbenzoylecgonine-2TMS ; 6 : Cocaéthylène ; 7 : Benzoylecgonine-TMS ; 8 : Norcocaéthylène-TMS ; 9 : Norcocaïne-TMS ; 10 : méta-hydroxy-benzoylecgonine-2TMS.

La résolution est satisfaisante.

L'utilisation d'un milieu simplifié tel que le tampon Krebs-Henseleit-bicarbonate de sodium pH 7,4 présente l'avantage, par rapport au milieu de culture Leibovitz L15, de ne montrer aucune interférence avec les molécules d'intérêt.

IV. CONCLUSION

Jusqu'à maintenant, c'est principalement l'analyse de la cocaïne et de ses métabolites majeurs, benzoylecgonine et ecgonine méthyl ester, qui ont fait l'objet d'études. De nombreuses matrices humaines ont été testées : cheveux [Kintz et Mangin, 1995], sang [Gaillard, 1997. Moriya et Hashimoto, 1996. Winecker, 1997], plasma [Bonate, 1995. Crouch, 1995. Moriya et Hashimoto, 1996], fluide amniotique [Gaillard, 1997], salive [Cone, 1997], tissus [Bonate, 1995. Moriya et Hashimoto, 1996] et urines [Crouch, 1995. Peterson, 1995].

Les premières méthodes pour l'analyse de la cocaïne et de la benzoylecgonine dans l'urine ont utilisé la chromatographie sur couche mince (CCM) et la détection colorimétrique [Crouch, 1995]. La chromatographie liquide haute performance utilisant un détecteur à barrettes de diode (CLHP / DBD) a également été développée [a)Roberts, 1992. Bonate, 1995. Fernandez, 1996].

Plus récemment, des travaux utilisant la chromatographie phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (CPG / SM) ont été publiés [Cone, 1997].

Pour notre étude, seul un couplage CPG / SM nous permet de mettre en évidence et d'identifier la cocaïne, le cocaéthylène et huit de leurs métabolites présents en faibles quantités dans un échantillon réduit. Les quantités présentes, particulièrement celles de certains métabolites comme l'ecgonine, sont en effet insuffisantes pour permettre une séparation et une identification par des méthodes classiques. Ainsi une méthode telle que la chromatographie phase gazeuse avec détection par ionisation de flamme (CPG / DIF) ne permet pas, en cas de profil chargé et / ou en présence de faibles quantités, d'être absolument sûr de l'identité de chaque molécule (variation possible des temps de rétention, faible

sensibilité...). Le couplage CPG / SM permet de se libérer de certaines contraintes tout en améliorant la spécificité et la sensibilité.

Les développements actuels portent sur la chromatographie phase liquide couplée à un spectromètre de masse (CPL / SM). La méthode séparative par CPL présente de nombreux avantages par rapport à la CPG dont le principal intérêt est qu'elle permet l'analyse de 90 % des molécules, alors que 20 % seulement de celles-ci présentent une application en CPG. Ceci est lié en grande partie aux problèmes de volatilité. Les problèmes de température, en particulier, sont supprimés avec la CPL.

CHAPITRE VI. VALIDATION DE LA TECHNIQUE ANALYTIQUE PAR CHROMATOGRAPHIE PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE

I. PROCEDURE DE VALIDATION	64
I.1. LINEARITE	64
I.1.1. PROCEDURE	65
I.1.2. RESULTATS	65
I.2. LIMITES DE LINEARITE	66
I.2.1. PROCEDURE	67
I.2.2. RESULTATS	67
I.3. PRECISION : PROCEDURE ET RESULTATS	67
I.4. RENDEMENTS D'EXTRACTION	69
II. CONCLUSION	70

CHAPITRE VI. VALIDATION DE LA TECHNIQUE ANALYTIQUE PAR CHROMATOGRAPHIE PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE

Un certain nombre de paramètres sont à considérer quant à la validation de la méthode d'extraction phase solide associée à une chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Cependant, si les principes généraux sont expliqués dans la littérature [Causon, 1997], il n'existe pas de normes précises pour l'effectuer.

I. PROCEDURE DE VALIDATION

I.1. LINEARITE

La linéarité est déterminée en utilisant des concentrations variables et en établissant une corrélation entre la concentration et la réponse. Il est en effet important que la méthode soit linéaire dans les limites de concentrations définies. Ici, la linéarité est définie entre 0 et 500 ng / mL.

**Chapitre VI. Validation de la technique analytique par chromatographie phase gazeuse
couplée à la spectrométrie de masse**

I.1.1. PROCEDURE

L'obtention de cinq gammes est résumée dans le tableau ci-dessous (Tableau 7).

Les surcharges sont effectuées rapidement afin de limiter l'hydrolyse spontanée de la cocaïne en benzoylecgonine.

Numéro de l'échantillon	1	2	3	4	5	6	7
Surcharges de chaque molécule (ng)	0	50	100	200	300	400	500
Volume de mélange partiel dans l'acétonitrile (µL)	0	3	6	12	18	24	30
Volume de mélange partiel dans le méthanol (µL)	0	2	4	8	12	16	20
Surcharges de chaque molécule-d ₃ (ng)	200	200	200	200	200	200	200
Volume de solution deutérée (µL)	2	2	2	2	2	2	2
Volume de tampon Krebs-Henseleit-bicarbonate de sodium pH 7,4 (mL)	1	1	1	1	1	1	1

Tableau 7. Tableau résumant l'obtention d'une gamme.

L'extraction et l'analyse de chaque point sont décrites respectivement dans les chapitres IV et V.

I.1.2. RESULTATS

Les résultats des dosages effectués sur les cinq gammes sont regroupés dans le Tableau 8.

**Chapitre VI. Validation de la technique analytique par chromatographie phase gazeuse
couplée à la spectrométrie de masse**

MOLECULES	CONCENTRATIONS	NOMBRE DE COURBES	PENTES ⁽²⁾	INTERCEPTS ⁽²⁾	COEFFICIENTS DE CORRELATION
Ecgonine méthyl ester	0-500 ng / mL	5	0,700 ± 0,076	8,051 ± 1,833	0.997 ± 0,001
Ecgonine éthyl ester		5	0,745 ± 0,073	8,809 ± 2,749	0.997 ± 0,001
Ecgonine		5	0,540 ± 0,121	14,47 ± 7,191	0.996 ± 0,001
Cocaïne		5	0,987 ± 0,028	2,847 ± 5,899	0.997 ± 0,001
Cocaéthylène		5	1,018 ± 0,114	-2,106 ± 3,636	0.996 ± 0,001
Benzoylecgonine		5	0,855 ± 0,028	3,419 ± 6,892	0.997 ± 0,001
Norcocaïne		5	0,419 ± 0,283	-2,484 ± 2,156	0.992 ± 0,001
Norcocaéthylène		3	0,474 ± 0,001	-9,680 ± 5,545	0.996 ± 0,001
Norbenzoylecgonine		5	0,359 ± 0,020	1,498 ± 3,471	0.993 ± 0,001
m-hydroxy -benzoylecgonine		5	0,324 ± 0,089	-1,654 ± 2,409	0.990 ± 0,001

Tableau 8. Caractéristiques des courbes de calibration⁽¹⁾.

⁽¹⁾ Les courbes de calibration sont exprimées selon $y = ax + b$. x est le rapport concentration de l'analyte / concentration du standard interne.

y est la surface du pic de l'analyte / surface du pic du standard interne.

⁽²⁾ Moyenne ± DS.

Les pentes pour l'ecgonine méthyl ester, l'ecgonine éthyl ester, la cocaïne, le cocaéthylène et la benzoylecgonine sont satisfaisantes. Les pentes faibles (valeurs < 0,5) de la norcocaïne, du norcocaéthylène, de la norbenzoylecgonine et de la méta-hydroxy-benzoylecgonine peuvent s'expliquer par le fait que les standards deutérés correspondants n'existent pas. Néanmoins, concernant l'ecgonine, dont le standard deutéré existe, la faible pente ne peut être expliquée.

I.2. LIMITES DE LINEARITE

Les limites de linéarité sont déterminées graphiquement.

**Chapitre VI. Validation de la technique analytique par chromatographie phase gazeuse
couplée à la spectrométrie de masse**

I.2.1. PROCEDURE

Une concentration limite est déterminée pour chaque molécule. Deux déterminations sont réalisées pour chaque molécule.

Les surcharges s'effectuent selon le tableau ci-dessous (Tableau 9).

Numéro de l'échantillon	1	2	3	4	5	6	7
Surcharges de chaque molécule (ng)	0	250	500	750	1000	1250	1500
Volume de mélange partiel dans l'acétonitrile (µL)	0	15	30	45	60	75	90
Volume de mélange partiel dans le méthanol (µL)	0	10	20	30	40	50	60
Surcharges de chaque molécule-d ₃ (ng)	200	200	200	200	200	200	200
Volume de solution deutérée (µL)	2	2	2	2	2	2	2
Volume de tampon Krebs-Henseleit-bicarbonate de sodium pH 7,4 (mL)	1	1	1	1	1	1	1

Tableau 9. Tableau résumant l'obtention des limites de linéarité.

L'extraction et l'analyse de chaque point sont décrites respectivement dans les chapitres IV et V.

I.2.2. RESULTATS

La limite de linéarité est de 500 ng / mL pour l'ecgonine méthyl ester, l'ecgonine éthyl ester, l'ecgonine et le norcocaéthylène ; de 1 000 ng / mL pour la cocaïne, le cocaéthylène, la benzoylecgonine, la norcocaïne, la norbenzoylecgonine et la méta-hydroxy-benzoylecgonine.

I.3. PRECISION : PROCEDURE ET RESULTATS

**Chapitre VI. Validation de la technique analytique par chromatographie phase gazeuse
couplée à la spectrométrie de masse**

La répétabilité : son estimation est réalisée en trois jours sur trois points de gamme (bas : 50 ng / mL ; moyen : 250 ng / mL ; haut : 500 ng / mL).

Le même jour sont réalisées une gamme et une série de dix points à la même concentration en molécules.

La moyenne, l'écart-type et le coefficient de variation de chaque série de points sont calculés.

Les résultats sont présentés dans le Tableau 10.

MOLECULES	NIVEAUX DE CONCENTRATION					
	50 ng / mL		250 ng / mL		500 ng / mL	
	CONCENTRATIONS	CV	CONCENTRATIONS	CV	CONCENTRATIONS	CV
	MOYENNES ± DS	(%)	MOYENNES ± DS	(%)	MOYENNES ± DS	(%)
Ecgonine méthyl ester	49,1 ± 0,66	1,35	251 ± 3,11	1,24	451 ± 2,37	0,53
Ecgonine éthyl ester	51,9 ± 3,39	6,52	256 ± 8,84	3,45	490 ± 10,4	2,12
Ecgonine	52,1 ± 6,32	12,1	244 ± 24,9	10,2	558 ± 12,9	2,31
Cocaïne	47,9 ± 3,25	6,79	233 ± 4,79	2,02	486 ± 21,0	4,31
Cocaéthylène	56,8 ± 5,56	9,79	246 ± 20,3	8,24	405 ± 16,5	4,09
Benzoylecgonine	55,4 ± 3,54	6,39	237 ± 12,6	5,30	464 ± 30,8	6,63
Norcocaïne	56,4 ± 9,08	16,1	ND	-	ND	-
Norcocaéthylène	ND	-	ND	-	172 ± 6,55	3,81
Norbenzoylecgonine	37,5 ± 6,09	16,2	ND	-	195 ± 23,0	11,8
m-hydroxy-benzoylecgonine	49,9 ± 3,67	7,36	168 ± 13,9	8,29	461 ± 37,8	8,18

Tableau 10. Evaluation de la répétabilité sur trois niveaux de concentration.

Chaque résultat est la moyenne de dix mesures.

ND : Non déterminé.

Pour neuf des dix molécules, la répétabilité effectuée sur le plus bas niveau de concentration (50 ng / mL) est acceptable avec des coefficients de variation inférieurs à 17 %. Elle n'a pu être déterminée pour le norcocaéthylène. Concernant la répétabilité sur le niveau de concentration moyen (250 ng / mL), les coefficients de variation sont satisfaisants (< 11 %). La répétabilité est non déterminée pour les trois dérivés N-déméthylés. La concentration moyenne de la méta-hydroxy-benzoylecgonine (168 ± 13,9 ng / mL) est faible. La répétabilité

effectuée sur le plus haut niveau de concentration (500 ng / mL) est acceptable avec des coefficients de variation inférieurs à 12 %. Elle n'a pu être déterminée pour la norcocaïne. Les concentrations moyennes pour le norcocaéthylène ($172 \pm 6,55$ ng / mL) et la norbenzoylecgonine ($195 \pm 23,0$ ng / mL) sont faibles.

La reproductibilité : son estimation est réalisée en cinq jours.

Le premier jour, trois solutions (de 10 mL minimum) à des concentrations en molécules différentes (basse : 50 ng / mL ; moyenne : 250 ng / mL ; haute : 500 ng / mL) sont préparées. Ces solutions sont conservées à (-20)°C.

Chaque jour, une gamme et deux points de chaque concentration sont extraits et analysés.

Les échantillons préparés en vue de l'étude de la reproductibilité sont instables. En effet, bien que les aliquots surchargés par les dix molécules soient conservés à (-20)°C, les dosages ont montré que les concentrations ne pouvaient être maintenues. Ce critère n'a pu être validé.

I.4. RENDEMENTS D'EXTRACTION

Les rendements d'extraction obtenus selon notre méthode d'extraction et analyse sont exposés dans le Tableau 11.

MOLECULES	RENDEMENTS D'EXTRACTION (%)
Ecgonine méthyl ester	102
Ecgonine éthyl ester	81
Ecgonine	47
Cocaïne	95
Cocaéthylène	80
Benzoylecgonine	101
Norcocaïne	70
Norcocaéthylène	71
Norbenzoylecgonine	51
méta-hydroxy -benzoylecgonine	84

Tableau 11. Evaluation des rendements d'extraction selon la procédure d'extraction / dérivatisation.

Les procédures d'extraction et analyse sont exposées à la Figure 6.

Notre méthode permet d'extraire simultanément dix molécules de polarités variables avec des rendements d'extraction de 47 % (ecgonine) à 102 % (ecgonine méthyl ester).

II. CONCLUSION

La validation de notre méthode s'est effectuée dans du tampon Krebs-Henseleit-bicarbonate de sodium pH 7,4. Celui-ci présente l'avantage, par rapport à l'urine, de limiter les interférences en CPG / SM.

Bien qu'il existe des recommandations, une méthode optimale de validation d'une technique analytique n'est pas définie au niveau international. Seuls certains critères de qualité indispensables à la fiabilité de nos résultats ont été contrôlés.

L'étude de la linéarité indique que la technique est fiable pour le domaine de concentrations investigué : 50 à 500 ng / mL.

Chapitre VI. Validation de la technique analytique par chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

De façon générale, l'étude de la répétabilité sur trois niveaux de concentration montre une instabilité pour les dérivés N-déméthylés (norcoïcaine, norcoïcacéthylène et norbenzoylecgonine).

L'étude de la reproductibilité montre la difficulté de conserver les échantillons de coïcaine, coïcacéthylène et métabolites à faibles concentrations. Elle permet ainsi de conclure qu'extraction et analyse des échantillons doivent s'effectuer dans les 24 heures ou bien qu'une conservation à (-80)°C des échantillons se révèle peut-être nécessaire.

Notre méthode permet d'extraire simultanément dix molécules de polarités variables avec des rendements d'extraction de 47 à 102 %.

CHAPITRE VII. INTERACTIONS COCAINE ET ALCOOL CHEZ LE RAT : EFFETS SUR LA PHARMACOCINETIQUE DE LA COCAINE

I. MATERIELS	72
I.1. PRODUITS CHIMIQUES	72
I.1.1. COMPOSES D'INTERET	72
I.1.2. AUTRES PRODUITS ET SOLUTIONS	73
I.2. ANIMAUX	74
II. ETUDE DES EFFETS DE L'ETHANOL SUR SUSPENSIONS D'HEPATOCYTES DE RAT SUPPLEMENTES EN COCAINE	74
II.1. CHOIX DES CONDITIONS EXPERIMENTALES	74
II.1.1. PRODUITS A TESTER	74
II.1.2. CONDITIONS D'INCUBATION	75
II.1.2.1. MATERIEL D'INCUBATION	75
II.1.2.2. MILIEUX D'INCUBATION	75
II.1.2.3. DUREE DU TRAITEMENT	75
II.2. OBTENTION D'UNE SUSPENSION D'HEPATOCYTES	76
II.2.1. ISOLEMENT DES HEPATOCYTES DE RAT	76
II.2.2. MISE EN SUSPENSION	77
II.3. ETUDE PRELIMINAIRE : VERIFICATION DE LA VIABILITE DES CELLULES	77
II.4. INTOXICATION AIGUE D'UNE SUSPENSION D'HEPATOCY- TES	78
III. DOSAGES	79

III. 1. DOSAGE DE LA COCAINE ET DE SES METABOLITES RESPECTIFS PAR CHROMATOGRAPHIE PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE	79
III.1.1. METHODE D'EXTRACTION / DERIVATISATION	79
III.1.2. CHROMATOGRAPHIE PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE	80
III. 2. DOSAGE DE L'ETHANOL PAR ANALYSE DE L'ESPACE DE TETE PAR CHROMATOGRAPHIE PHASE GAZEUSE COUPLEE A UNE DETECTION PAR IONISATION DE FLAMME	80
IV. ANALYSES STATISTIQUES	80
V. RESULTATS	81
V.1. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION D'ETHANOL SUR LA CONCENTRATION DE COCAINE DANS LE MILIEU D'INCUBATION	81
V.2. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION D'ETHANOL SUR LA PRODUCTION DE BENZOYLECGONINE DANS LE MILIEU D'INCUBATION	82
V.3. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION D'ETHANOL SUR LA PRODUCTION D'ECGONINE METHYL ESTER DANS LE MILIEU D'INCUBATION	84
V.4. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION D'ETHANOL SUR LA PRODUCTION D'ECGONINE DANS LE MILIEU D'INCUBATION	86
V.5. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION D'ETHANOL SUR LA PRODUCTION DE NORCOCAINE DANS LE MILIEU D'INCUBATION	87

V.6. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION D'ETHANOL SUR LA PRODUCTION DE COCAETHYLENE DANS LE MILIEU D'INCUBATION	88
VI. CONCLUSION	90

CHAPITRE VII. INTERACTIONS COCAINE ET ALCOOL CHEZ LE RAT : EFFETS SUR LA PHARMACOCINETIQUE DE LA COCAINE

Parce qu'une bonne corrélation entre la pharmacocinétique et certains effets pharmacologiques de la cocaïne a été rapportée [*Hurd, 1988. Nicolaysen, 1988. (b)Hedaya et Pan, 1997*], il est supposé une altération du métabolisme de la cocaïne lorsque celle-ci est combinée à une prise éthylique.

Le but de cette partie expérimentale est d'étudier l'influence de l'éthanol sur le métabolisme de la cocaïne afin de caractériser les voies métaboliques induites et / ou inhibées par l'adjonction de cet autre toxique d'après un modèle cellulaire, les hépatocytes de rat en suspension.

I. MATERIELS

I.1. PRODUITS CHIMIQUES

I.1.1. COMPOSES D'INTERET

Chapitre VII. Interactions cocaïne et alcool chez le rat : effets sur la pharmacocinétique de la cocaïne

Les ampoules de 1 mL dosées à 1 g / L (benzoylecgonine, benzoylecgonine-d₃, norbenzoylecgonine·HCl, méta-hydroxy-benzoylecgonine, cocaïne-d₃, ecgonine éthyl ester) et à 0,1 g / L (cocaéthylène, cocaéthylène-d₃, ecgonine·HCl, ecgonine-d₃·HCl, ecgonine méthyl ester, ecgonine méthyl ester-d₃, norcocaïne, norcocaéthylène·HCl) sont fournis par Promochem.

Les produits de référence de concentration 1 g / L sont utilisés pour préparer des solutions de 100 mg / L, par dilution dans le solvant approprié (méthanol ou acétonitrile).

Concernant les analogues deutérés, les solutions à 1 g / L sont ramenées à 100 mg / L par dilution dans le solvant approprié.

La solution de cocaïne à 6 g / L est préparée dans l'acétonitrile.

L'éthanol 99 % vient de chez Merck.

Les solutions étalons d'éthanol (0,5 ; 0,8 ; 1,5 et 3 g / L) sont également fournis par Merck. Elles sont conditionnées en ampoules de 1 mL.

I.1.2. AUTRES PRODUITS ET SOLUTIONS

La collagénase H (0,32 U / mg) est fournie par Roche Diagnostics.

L'héparine choay[®] (25000 U.I. / 5 mL) est fournie par Sanofi Winthrop.

Le tampon Krebs-Henseleit-bicarbonate de sodium (120 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 1,2 mM KH₂PO₄, 1,2 mM MgSO₄, 24 mM NaHCO₃) est ajusté à pH 7,4 par HCl 5 N.

Le même tampon Krebs-Henseleit-bicarbonate de sodium pH 7,4 contenant 1,3 mM CaCl₂ est préparé.

NaCl est fourni par Prolabo. KCl, KH₂PO₄, MgSO₄·7H₂O, NaHCO₃ et CaCl₂·2H₂O sont produits par Sigma.

La solution aqueuse de pH 3,0 est préparée le jour même à partir d'eau désionisée, ajustée à pH 3,0 avec une solution HCl 1 N.

Le solvant d'élution (méthanol contenant 3 % d'ammoniaque 25 %) est préparé extemporanément.

Tous les solvants organiques de qualité analytique (acétonitrile, éthanol, méthanol, acide chlorhydrique 30 %, ammoniaque 25 %, acide perchlorique 40 %) sont fournis par Merck.

Le mélange mixte de dérivatisation est préparé dans les proportions respectives [MSTFA : TMCS : TMSI] [100 : 5 : 2 ; v : v : v].

Le N-méthyl-N-triméthylsilyltrifluoroacétamide (MSTFA), le N-*tert*-butyldiméthylsilyl-N-méthyltrifluoroacétamide (MTBSTFA) et le N-*tert*-butylsilyltrifluoroacétamide (BSTFA) contenant 1 % TMCS sont fournis par Pierce. Le triméthylchlorosilane (TMCS) et le 1-(triméthylsilyl)-imidazole (TMSI) proviennent de chez Fluka.

I.2. ANIMAUX

Les rats adultes mâles Sprague-Dawley (200 g \pm 20) sont fournis par Iffa-Credo. Ils sont gardés une semaine à température constante (25°C) avant sacrifice.

II. ETUDE DES EFFETS DE L'ETHANOL SUR SUSPENSIONS D'HEPATOCYTES DE RAT SUPPLEMENTES EN COCAINE

II.1. CHOIX DES CONDITIONS EXPERIMENTALES

II.1.1. PRODUITS A TESTER

Les données sur les caractéristiques physicochimiques de la cocaïne et de l'éthanol sont essentielles avant de débiter l'étude.

Les principaux paramètres à considérer sont :

- La solubilité des deux composés : les deux toxiques sont hydrosolubles.
- Les modifications du pH et de l'osmolarité lors de l'addition de l'un ou des deux toxiques au milieu d'incubation. Aucune variation significative du pH n'est observée selon nos conditions expérimentales.
- Les interactions du produit avec les constituants du milieu. Notre milieu d'incubation étant le tampon Krebs-Henseleit-bicarbonate de sodium pH 7,4, nous nous sommes affranchis de ce problème.

II.1.2. CONDITIONS D'INCUBATION

II.1.2.1. MATERIEL D'INCUBATION

Les boîtes de Pétri ou les boîtes multipuits sont les supports les plus fréquents. Cependant, de telles boîtes ne peuvent être retenues lorsqu'il s'agit de tester un composé volatil tel que l'éthanol, à moins d'isoler chaque puits de manière étanche. Nos études devant être réalisées en grand nombre, nous avons opté pour des tubes à hémolyse.

II.1.2.2. MILIEUX D'INCUBATION

Les milieux d'incubation sont très variés. Ils vont du simple tampon à des milieux très riches et sophistiqués. Ces derniers ne sont en général pas nécessaires pour des traitements de courte durée. Le choix du milieu doit aussi prendre en compte les interventions possibles entre le ou les composé(s) à tester et ses constituants.

Entre le tampon Krebs-Henseleit et le milieu de Leibovitz L15, nous avons choisi le premier. Ce choix est justifié par le fait qu'un milieu riche pour un traitement de courte durée n'est pas utile. De plus, les composés du milieu Leibovitz L15 apparaissent en CPG / SM et interfèrent avec les métabolites recherchés.

II.1.2.3. DUREE DU TRAITEMENT

La durée du traitement varie selon le modèle expérimental utilisé. Les hépatocytes fraîchement isolés ont en suspension une durée de vie courte, limitée à quelques heures. La survie prolongée des hépatocytes n'est possible que s'ils sont maintenus en culture, attachés à un support.

Nous avons opté pour des hépatocytes isolés de rat en suspension. La durée du traitement sera déterminée par le test au MTT.

II.2. OBTENTION D'UNE SUSPENSION D'HEPATOCYTES

La technique utilisée est celle de Berry et Friend [Berry et Friend, 1969] modifiée par Groen [Groen, 1982]. Les hépatocytes isolés sont obtenus à partir du foie de rat par dissociation enzymatique *in situ* puis mis en suspension.

II.2.1. ISOLEMENT DES HEPATOCYTES DE RAT

Afin d'obtenir un pourcentage élevé de cellules intactes (supérieur à 95 %), la perfusion du foie à la collagénase est une méthode de choix.

Les hépatocytes sont isolés du foie de rat adulte mâle Sprague-Dawley (200 g \pm 20). Après anesthésie du rat au Nesdonal® (0,3 mL / 100 g) par voie intrapéritonéale et héparinisation par voie fémorale, le foie est lavé *in situ* au tampon Krebs-Henseleit-bicarbonate de sodium pH 7,4 à 37°C sous un mélange O₂ / CO₂ (95 / 5), par perfusion de la veine porte (500 mL ; débit de 20 mL / min). La dissociation des cellules hépatiques s'effectue par le biais d'une solution de collagénase H à 0,025 % (p / v) dans du tampon Krebs-Henseleit-bicarbonate de sodium pH 7,4 contenant 1,3 mM CaCl₂, à 37°C (400 mL ; débit de 40 mL / min). Après isolement du foie et déchirement de la capsule de Glisson dans du tampon Krebs-Henseleit-bicarbonate de sodium pH 7,4, les cellules sont dispersées par agitation. La suspension obtenue subit une filtration afin d'éliminer les amas cellulaires. La suspension cellulaire est ensuite lavée trois fois par centrifugations successives (1500 rpm ; 3 minutes à 4°C) dans du tampon Krebs-Henseleit-bicarbonate de sodium pH 7,4.

II.2.2. MISE EN SUSPENSION

Le culot cellulaire est repris par du tampon Krebs-Henseleit-bicarbonate de sodium pH 7,4.

Le contrôle de la viabilité et la numération des hépatocytes isolés vivants sont effectués au microscope optique, sur cellule de Mallassez, par le test d'exclusion au Bleu Trypan. Pour l'ensemble des expériences, la viabilité est au moins de 85 %. Une perfusion permet d'obtenir 400 à 600 millions d'hépatocytes.

II.3. ETUDE PRELIMINAIRE : VERIFICATION DE LA VIABILITE DES CELLULES

La viabilité des cellules non intoxiquées sur des temps courts doit être vérifiée par le test du [bromure de 3 (4, 5-diméthylthiazol-2-yl)-2, 5-diphényltétrazolium] ou MTT (annexe II).

1,5 millions d'hépatocytes sont mis en suspension, dans des tubes à hémolyse, dans 2 mL de tampon Krebs-Henseleit-bicarbonate de sodium pH 7,4 et incubés à 37°C sur des temps courts (60, 120, 180, 240, 300 et 360 minutes).

Avant d'appliquer la procédure du test au MTT, la suspension cellulaire est diluée dans le tampon de sorte d'obtenir 5000 hépatocytes / 150 µL. Pour chaque temps d'incubation, deux mesures sont effectuées.

Les résultats du test de viabilité sont exposés à la Figure 9.

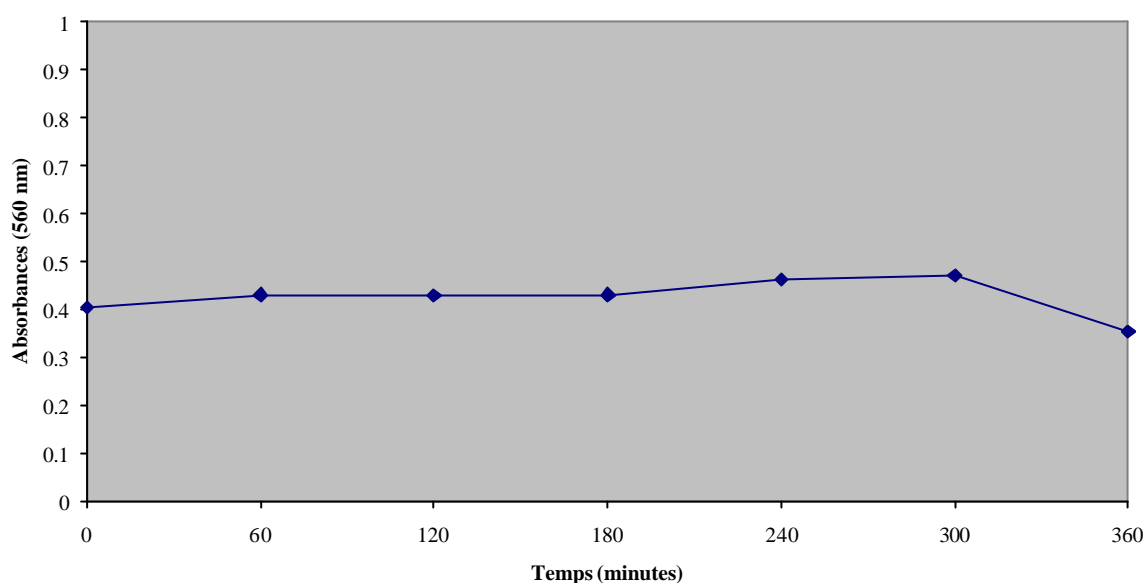


Figure 9. Etude de la viabilité des hépatocytes de rat en suspension par le test au MTT.

Les hépatocytes (1,5 millions) sont incubés en l'absence de cocaïne et d'éthanol dans le tampon Krebs-Henseleit-bicarbonate de sodium pH 7,4, à 37°C, sur des temps courts.

Pour chaque temps d'incubation, deux mesures sont effectuées.

Aucune perte significative de la viabilité des hépatocytes n'est observée pour des temps d'incubation de 0 à 6 heures dans le tampon Krebs-Henseleit-bicarbonate de sodium pH 7,4, à 37°C.

II.4. INTOXICATION AIGUE D'UNE SUSPENSION D'HEPATOCYTES

Dans des tubes à hémolyse, 1,5 millions d'hépatocytes sont mis en suspension dans 2 mL de tampon Krebs-Henseleit-bicarbonate de sodium pH 7,4. L'incubation se déroule à 37°C sur des temps de 0, 30, 60, 120 et 240 minutes. Pour chaque temps, la suspension est supplémentée par de la cocaïne seule (500 μ M) ou en présence d'éthanol à l'une des trois concentrations définies (20, 40 et 80 mM).

Les contrôles sont constitués par les hépatocytes incubés sans toxique à différents temps.

Dès la sortie des tubes de l'incubateur, ceux-ci sont refroidis très rapidement dans de la glace afin d'éviter toute évaporation de l'éthanol à l'ouverture du tube.

Le blocage du métabolisme de la cocaïne et de l'éthanol est obtenu par addition de 150 μL HClO_4 40 % à la suspension cellulaire. Après 3 minutes de centrifugation à 5000 rpm, 1,5 mL de chaque surnageant sont prélevés.

De façon à ne pas dépasser la limite de sensibilité en CPG / SM, les surnageants doivent être dilués au 1 / 500^{ième}. Soit prélever un aliquot de chaque essai (10 μL) et additionner le volume nécessaire de tampon Krebs-Henseleit-bicarbonate de sodium pH 7,4. Ces échantillons sont ramenés à pH 3,0 par NaOH 5 N (10 μL) et 1 N (2 μL). Ils sont conservés à 4°C jusqu'à extraction.

Les volumes restants sont conservés hermétiquement à 4°C. Ils sont utilisés pour le dosage de l'éthanol par analyse de l'espace de tête par CPG / DIF.

III. DOSAGES

III.1. DOSAGE DE LA COCAINE ET DE SES METABOLITES RESPECTIFS PAR CHROMATOGRAPHIE PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE

III.1.1. METHODE D'EXTRACTION / DERIVATISATION

La méthode d'extraction / dérivatisation est celle décrite au Chapitre IV.

Les surnageants, conservés à 4°C, sont extraits et dérivés dans les 24 heures.

III.1.2. CHROMATOGRAPHIE PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE

Les conditions opératoires utilisés en CPG / SM sont résumées dans le Tableau 6 du Chapitre V.

III.2. DOSAGE DE L'ETHANOL PAR ANALYSE DE L'ESPACE DE TETE PAR CHROMATOGRAPHIE PHASE GAZEUSE COUPLEE A UNE DETECTION PAR IONISATION DE FLAMME

La procédure de dosage de l'éthanol par analyse de l'espace de tête par CPG / DIF est exposée dans la Partie II, Chapitre I.

IV. ANALYSES STATISTIQUES

Pour chaque effet étudié, deux séries expérimentales indépendantes sont réalisées.

L'analyse statistique des résultats comprend en général une analyse de variance à deux facteurs (ANOVA deux facteurs) :

- le facteur groupe, caractérisé par chaque dose d'éthanol, et
 - le facteur durée d'exposition,
- complétée par un test à posteriori de Fischer.

V. RESULTATS

Dans cette étude, la cocaïne, la benzoylecgonine, l'ecgonine méthyl ester, l'ecgonine, la norcocaïne et le cocaéthylène sont analysés par CPG / SM.

L'éthanol est mesuré par analyse de l'espace de tête par CPG / DIF.

V.1. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION D'ETHANOL SUR LA CONCENTRATION DE COCAINE DANS LE MILIEU D'INCUBATION

La disparition du composé-mère, la cocaïne, est le résultat de réactions d'hydrolyses chimique et enzymatique et d'un métabolisme N-oxydatif.

Les résultats sont exposés à la Figure 10. La disparition de cocaïne (500 μ M) dans le milieu d'incubation constitué d'hépatocytes de rat en suspension dans le tampon Krebs-Henseleit-bicarbonate de sodium pH 7,4 est dépendante du temps ($p < 0,001$; ANOVA deux facteurs) et non significativement influencée par l'addition d'éthanol, sauf pour la concentration la plus forte (concentration moyenne de cocaïne seule *versus* concentration moyenne de cocaïne + 80 mM d'éthanol ; $p = 0,05$; test à postériori de Fisher). Après 120 minutes d'exposition à la cocaïne seule ou en combinaison avec l'éthanol, 38,9 à 46,1 % en moyenne de la concentration initiale de cocaïne a été convertie en métabolites. Les différences de concentrations en cocaïne ne sont influencées par la présence d'éthanol qu'après 30 minutes d'incubation ($p < 0,0001$; test à postériori de Fisher). Entre 60 et 240 minutes, une saturation des voies métaboliques semble être observée.

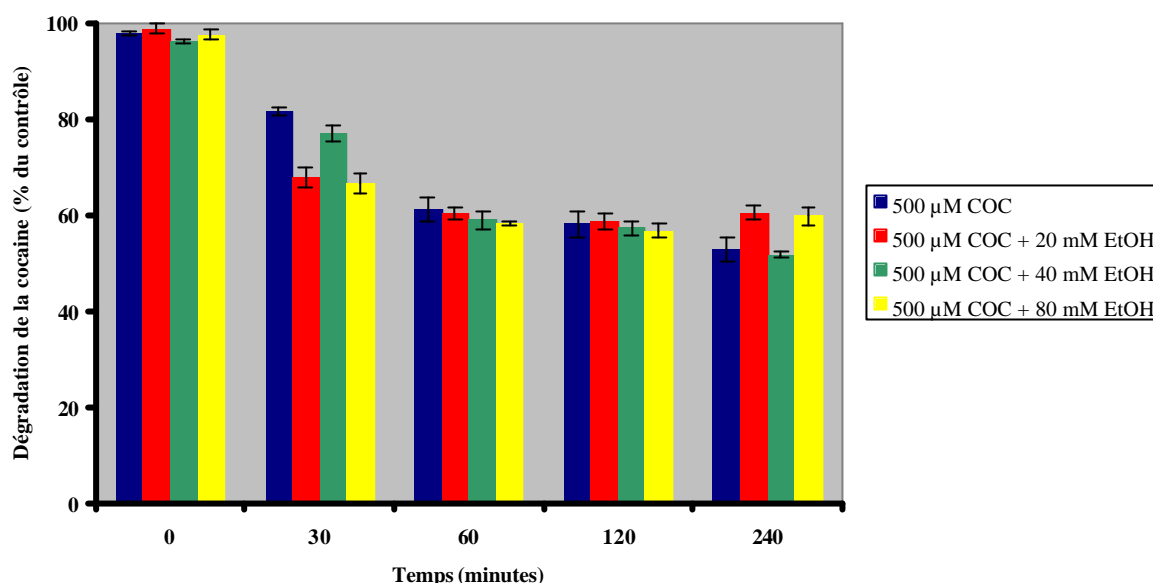


Figure 10. Dégradation de la cocaïne en présence d'hépatocytes isolés de rat en l'absence ou en présence d'éthanol.

Les hépatocytes ($1,5 \times 10^6$ cellules / mL) sont exposés à 500 μ M de cocaïne seule ou en combinaison avec 20, 40 ou 80 mM d'éthanol. La cocaïne est analysée par CPG / SM.

Les contrôles sont constitués par des hépatocytes incubés sans toxique à différents temps.

Les valeurs représentent la moyenne de deux réplicats \pm ESM.

V.2. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION D'ETHANOL SUR LA PRODUCTION DE BENZOYLECGONINE DANS LE MILIEU D'INCUBATION

La benzoylecgonine est le produit d'un métabolisme médié par une carboxylesterase hépatique et d'une hydrolyse chimique spontanée lorsque le pH est voisin du pH physiologique.

Pour des temps de 30 à 120 minutes, la production de benzoylecgonine par les hépatocytes exposés à 500 μ M de cocaïne seule augmente (Figure 11). L'effet inverse est observé pour une durée d'incubation de 240 minutes ; ce phénomène traduit peut-être une

saturation métabolique des cellules ou une métabolisation de la benzoylecgonine en ecgonine. Les valeurs moyennes des concentrations de benzoylecgonine sont significativement modifiées en fonction du temps d'incubation et de la concentration d'éthanol ($p < 0,001$; ANOVA deux facteurs). En effet, il est observé une diminution progressive des valeurs moyennes des concentrations de benzoylecgonine en fonction de la dose d'éthanol, tout temps d'incubation confondu. En combinaison avec 20 mM d'éthanol et pour des temps de 60 et 120 minutes, les valeurs moyennes des concentrations de benzoylecgonine diminuent respectivement de 55 et 32 %. En présence de 40 ou 80 mM d'éthanol, les valeurs moyennes des concentrations de benzoylecgonine sont pratiquement identiques, tout temps confondu. Pour des temps de 60 à 240 minutes d'incubation, des concentrations de 40 et 80 mM d'éthanol diminuent significativement la production de benzoylecgonine ($p < 0,001$; test à postériori de Fisher). Cette observation peut traduire la stimulation d'une autre voie métabolique au détriment de celle conduisant à la benzoylecgonine ou une mort des hépatocytes aux deux plus fortes concentrations en éthanol.

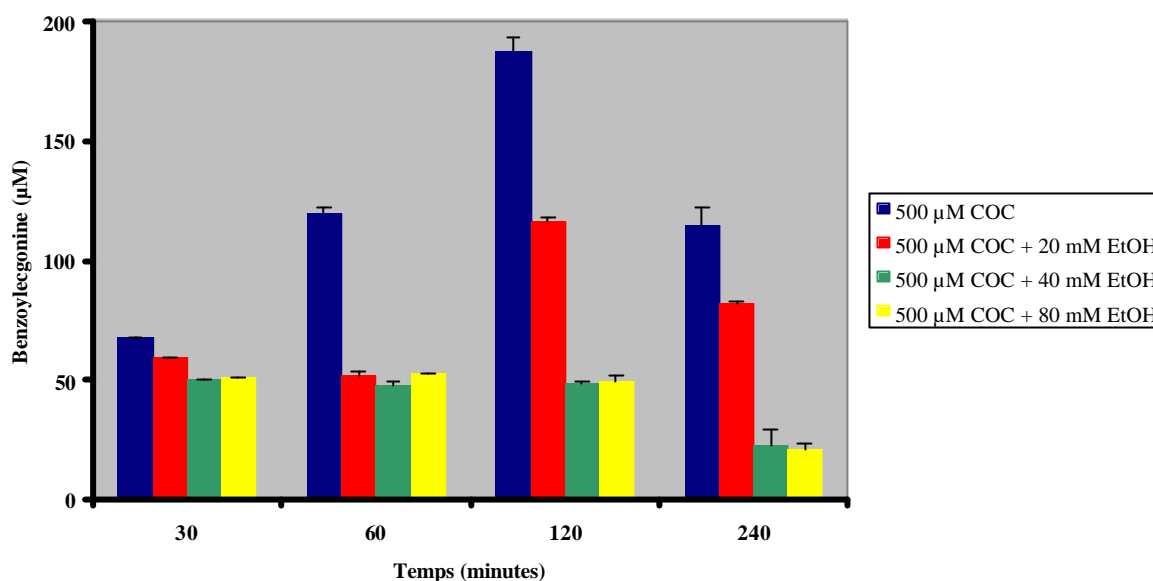


Figure 11. Formation de benzoylecgonine sur hépatocytes isolés de rat exposés à de la cocaïne en l'absence ou en présence d'éthanol.

Les hépatocytes ($1,5 \times 10^6$ cellules / mL) sont exposés à 500 μ M de cocaïne seule ou en combinaison avec 20, 40 ou 80 mM d'éthanol. La benzoylecgonine est analysée par CPG / SM.

Les contrôles sont constitués par des hépatocytes incubés sans toxique à différents temps.

Les valeurs représentent la moyenne de deux réplicats \pm ESM.

V.3. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION D'ETHANOL SUR LA PRODUCTION D'ECGONINE METHYL ESTER DANS LE MILIEU D'INCUBATION

L'ecgonine méthyl ester est le produit d'un métabolisme médié par une carboxylesterase hépatique.

L'ecgonine méthyl ester, autre métabolite produit lors du processus de détoxification de la cocaïne, n'apparaît que pour des temps de 120 et 240 minutes. Les valeurs moyennes des concentrations d'ecgonine méthyl ester évoluent de façon significativement différente dans

les différents groupes, en fonction des durées d'incubation ($p < 0,0001$; ANOVA deux facteurs). En présence d'éthanol, l'augmentation des valeurs moyennes des concentrations d'ecgonine méthyl ester est significative pour des concentrations de 20 ($p = 0,013$; test à postériori de Fisher) et 80 mM d'éthanol ($p < 0,0001$; test à postériori de Fisher). Tout temps confondu, une concentration de 80 mM d'éthanol stimule de façon significative la production d'ecgonine méthyl ester ($p < 0,0001$; test à postériori de Fisher) *versus* 20 et 40 mM. Toute dose confondue, les valeurs moyennes des concentrations en ecgonine méthyl ester mesurées aux temps 120 et 240 minutes sont significativement différentes ($p < 0,0001$; test à postériori de Fisher).

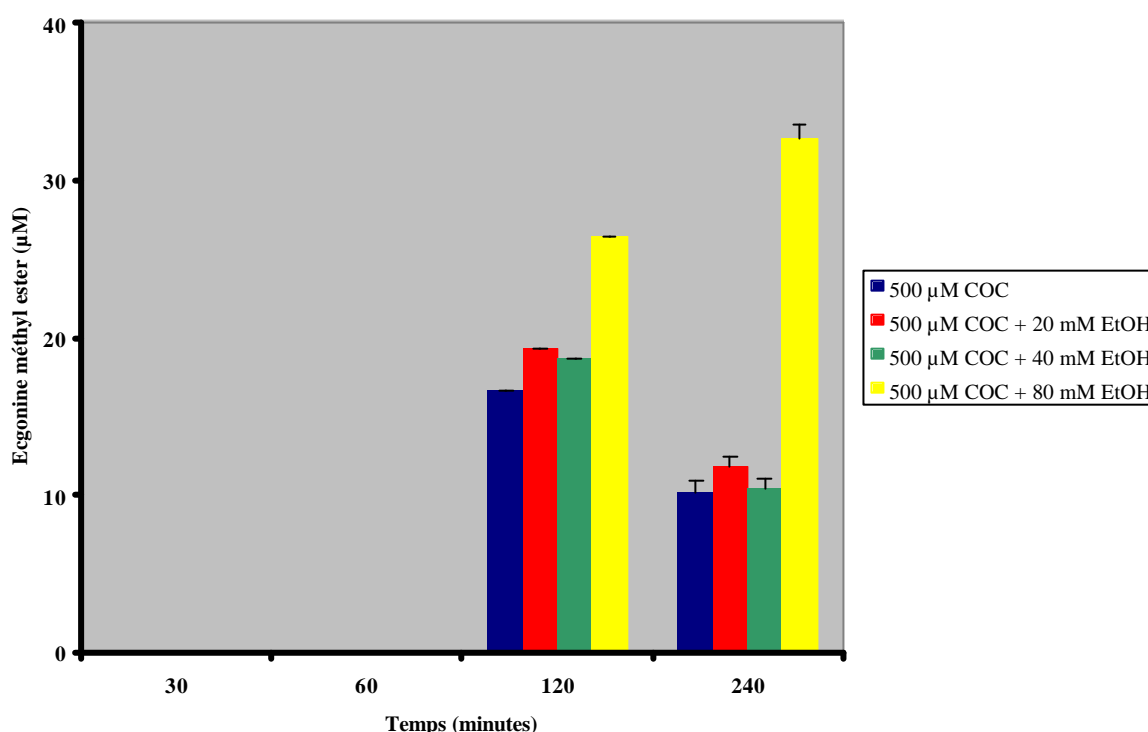


Figure 12. Formation d'ecgonine méthyl ester sur hépatocytes isolés de rat exposés à de la cocaïne en l'absence ou en présence d'éthanol.

Les hépatocytes ($1,5 \times 10^6$ cellules / mL) sont exposés à 500 μM de cocaïne seule ou en combinaison avec 20, 40 ou 80 mM d'éthanol. L'ecgonine méthyl ester est analysée par CPG / SM.

Les contrôles sont constitués par des hépatocytes incubés sans toxique à différents temps.

Les valeurs représentent la moyenne de deux réplicats \pm ESM.

V.4. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION D'ETHANOL SUR LA PRODUCTION D'ECGONINE DANS LE MILIEU D'INCUBATION

L'ecgonine, métabolite final des voies de détoxification de la cocaïne et du cocaéthylène, n'apparaît qu'après 240 minutes de métabolisation par les hépatocytes (Figure 13). Les concentrations moyennes d'ecgonine sont significativement différentes en fonction de la concentration en éthanol ($p = 0,003$; ANOVA deux facteurs). Il apparaît que la production d'ecgonine est significativement stimulée par la présence de 80 mM d'éthanol ($p = 0,002$; test à postériori de Fisher) alors qu'elle est diminuée par des concentrations inférieures (80 mM d'éthanol *versus* 20 mM, $p = 0,001$, test à postériori de Fisher ; 80 mM d'éthanol *versus* 40 mM, $p = 0,001$, test à postériori de Fisher).

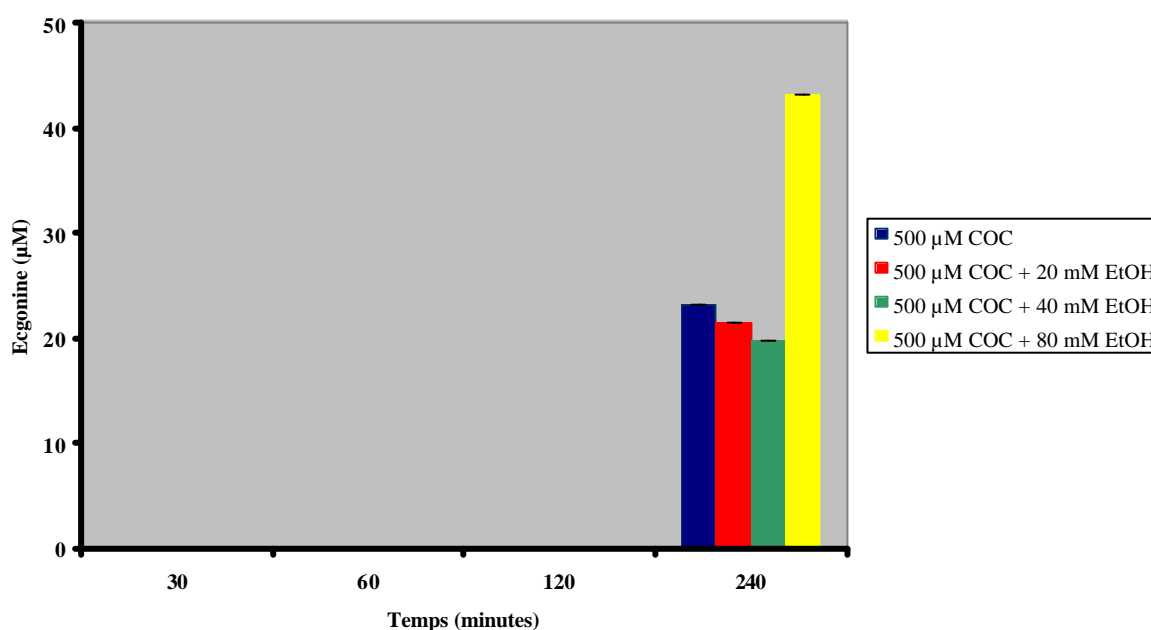


Figure 13. Formation d'ecgonine sur hépatocytes isolés de rat exposés à de la cocaïne en l'absence ou en présence d'éthanol.

Les hépatocytes ($1,5 \times 10^6$ cellules / mL) sont exposés à 500 µM de cocaïne seule ou en combinaison avec 20, 40 ou 80 mM d'éthanol. L'ecgonine est analysée par CPG / SM.

Les contrôles sont constitués par des hépatocytes incubés sans toxique à différents temps.

Les valeurs représentent la moyenne de deux réplicats \pm ESM.

V.5. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION D'ETHANOL SUR LA PRODUCTION DE NORCOCAINE DANS LE MILIEU D'INCUBATION

La norcocaïne est formée via le métabolisme oxydatif de la cocaïne.

La norcocaïne n'apparaît que pour des temps de 120 et 240 minutes. Pour chacun de ces deux temps, chaque concentration en éthanol (20, 40 et 80 mM) présente un effet significativement différent sur la production de norcocaïne ($p < 0,0001$; ANOVA deux facteurs). Durant ces deux périodes, dans des hépatocytes de rat exposés à 500 μ M de cocaïne seule ou en combinaison avec 20 ou 40 mM d'éthanol, il existe une augmentation temps et dose dépendante de la formation de norcocaïne (Figure 14). De plus, une concentration en éthanol de 40 mM *versus* 20 mM ($p = 0,006$; test à postériori de Fisher) augmente significativement la concentration de norcocaïne formée. Au contraire, une concentration de 80 mM d'éthanol *versus* 20 et 40 mM inhibe de façon significative ($p < 0,0001$; test à postériori de Fisher) la production de norcocaïne par les hépatocytes.

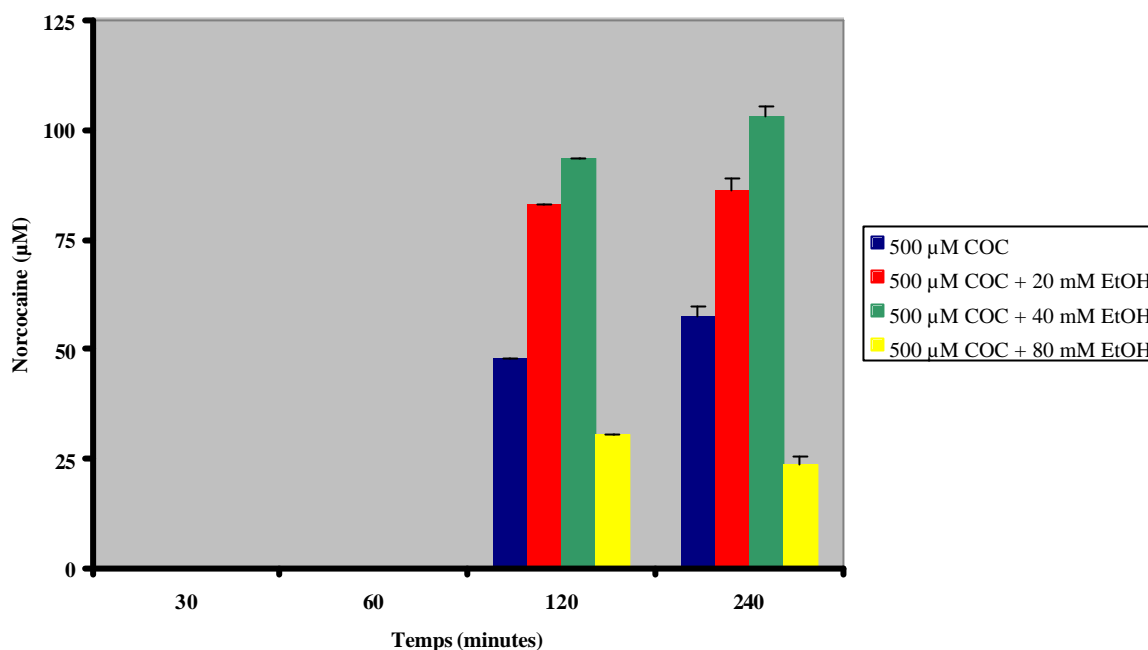


Figure 14. Formation de norcocaine sur hépatocytes isolés de rat exposés à de la cocaïne en l'absence ou en présence d'éthanol.

Les hépatocytes ($1,5 \times 10^6$ cellules / mL) sont exposés à 500 µM de cocaïne seule ou en combinaison avec 20, 40 ou 80 mM d'éthanol. La norcocaine est analysée par CPG / SM.

Les contrôles sont constitués par des hépatocytes incubés sans toxique à différents temps.

Les valeurs représentent la moyenne de deux réplicats \pm ESM.

V.6. INFLUENCE DE LA CONCENTRATION D'ETHANOL SUR LA PRODUCTION DE COCAETHYLENE DANS LE MILIEU D'INCUBATION

En présence d'éthanol, la cocaïne subit une transesterification en cocaéthylène médiée par une carboxylesterase hépatique.

Une production significative de cocaéthylène est observée en fonction du temps et de la concentration en éthanol (interaction groupe / temps, $p < 0,0001$; ANOVA deux facteurs) (Figure 15). La concentration moyenne en cocaéthylène est significativement augmentée ($p <$

0,0001 ; test à postériori de Fisher) entre 20 et 40 mM d'éthanol. Au total, après une période d'exposition de 120 minutes à 500 μ M de cocaïne en combinaison avec 20, 40 ou 80 mM d'éthanol, respectivement environ 5,2, 10,3 et 8,5 % de cocaïne additionnée sont convertis en cocaéthylène. La chute de production de cocaéthylène observée après avoir incubé la cocaïne pendant 240 minutes avec l'une des trois concentrations en éthanol en présence d'hépatocytes est significative ($p < 0,0001$; test à postériori de Fisher). Ce phénomène traduit peut-être une saturation métabolique des cellules ou une métabolisation du cocaéthylène en ecgonine éthyl ester.

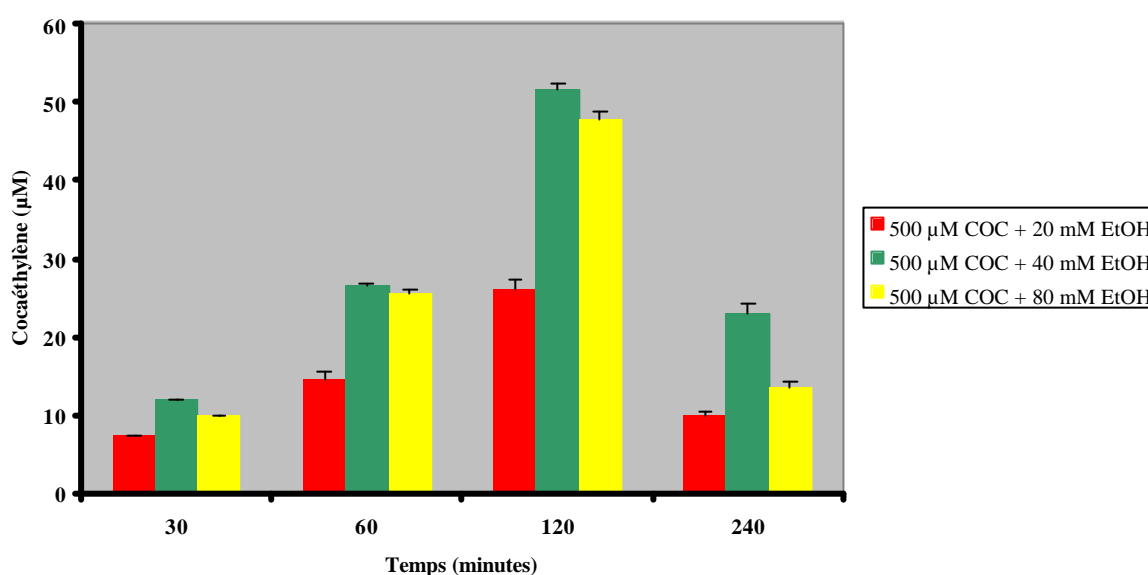


Figure 15. Apparition de cocaéthylène sur hépatocytes isolés de rat exposés à de la cocaïne en présence d'éthanol.

Les hépatocytes ($1,5 \times 10^6$ cellules / mL) sont exposés à 500 μ M de cocaïne en combinaison avec 20, 40 ou 80 mM d'éthanol. Le cocaéthylène est analysé par CPG / SM.

Les contrôles sont constitués par des hépatocytes incubés sans toxique à différents temps.

Les valeurs représentent la moyenne de deux répliquats \pm ESM.

Lorsque sont comparées les quantités produites de métabolites (benzoylecgonine, ecgonine méthyl ester, ecgonine, norcocaïne et cocaéthylène), la benzoylecgonine est le principal composé détecté sur nos temps courts, quelque soit la condition de traitement. Durant ces mêmes temps, le cocaéthylène est détecté. L'ecgonine méthyl ester ainsi que

l'ecgonine sont détectées en faibles quantités et ce pour un temps égal ou supérieur à 120 minutes d'incubation. La norcocaïne n'apparaît qu'à partir de 120 minutes d'incubation.

VI. CONCLUSION

La disparition de cocaïne peut être le résultat d'une hydrolyse spontanée ou enzymatique avec formation de benzoylecgonine et d'ecgonine méthyl ester. Ce même composé peut aussi entrer dans une voie de métabolisation mineure, l'oxydation par N-déméthylation, et être converti en norcocaïne. De plus, en présence d'éthanol, la cocaïne peut être transesterifiée en cocaéthylène. Il a en effet été montré que l'hydrolyse du groupe méthyl ester de la cocaïne pour produire benzoylecgonine et méthanol est médiée par une carboxylesterase hépatique forme 1; cette même enzyme, en présence d'éthanol, catalyse la transesterification de la cocaïne en cocaéthylène [Dean, 1991]. Cette voie métabolique est importante d'un point de vue toxicologique depuis qu'il a été montré que la production de cocaéthylène, métabolite pharmacologiquement actif, était accompagnée par une diminution de la transformation de cocaïne en son métabolite toxicologiquement inactif, la benzoylecgonine [Dean, 1991]. L'ecgonine méthyl ester produite en plus faible quantité par rapport à la benzoylecgonine ne possède pas d'activité toxicologique [Thompson, 1979].

Nous avons étudié le métabolisme de la cocaïne (500 μ M) en l'absence ou en présence de trois concentrations d'éthanol (20, 40 et 80 mM) sur hépatocytes isolés de rat en suspension [Bouis et Boelsterli, 1990].

Nos résultats préliminaires indiquent que la cocaïne est captée et métabolisée par les cellules hépatiques. L'addition d'éthanol à des hépatocytes exposés à de la cocaïne révèle que celui-ci n'a aucun effet sur la cinétique de dégradation de la cocaïne (Figure 10). L'apparition précoce de benzoylecgonine diminue pour les temps d'incubation les plus longs et pour la concentration en éthanol la plus forte (Figure 11). L'apparition retardée d'ecgonine méthyl ester est fonction de la concentration en éthanol, exception faite de la concentration la plus forte (Figure 12). Cette apparition tardive peut être mise en relation avec l'inhibition de la voie métabolique conduisant à la production de benzoylecgonine. L'ecgonine n'apparaît

qu'au temps d'incubation le plus long (Figure 13) ; sa formation est particulièrement stimulée par la concentration en éthanol la plus forte. Cette apparition peut traduire une dégradation de la benzoylecgonine et de l'ecgonine méthyl ester en ecgonine. La norcocaïne n'est détectée que pour des temps de 120 et 240 minutes, ce qui laisse supposer que sa formation est temps dépendante (Figure 14). Les concentrations de norcocaïne augmentent pour des concentrations en éthanol de 20 et 40 mM. L'inhibition du cytochrome P-450 IIE1 (la forme inductible par l'éthanol) par une concentration en éthanol de 80 mM ne peut être invoquée, celui-ci n'étant pas impliqué dans le métabolisme de la cocaïne [(a)Boelsterli, 1991]. Ceci pourrait suggérer que de la N-hydroxy-norcocaïne est produite. L'apparition précoce de cocaéthylène augmente en fonction de la concentration en éthanol et du temps, sauf pour la plus forte dose en éthanol et la durée d'incubation la plus longue (Figure 15). Cette observation pourrait confirmer que la benzoylecgonine et le cocaéthylène sont produits par la même enzyme [Dean, 1991]. De plus, notre étude confirme que l'addition d'éthanol à des cellules hépatiques contenant de la cocaïne résulte en la formation de cocaéthylène avec une décroissance de la formation de benzoylecgonine, comme observé précédemment chez la souris et sur un surnageant hépatique humain [Roberts, 1993] et sur extrait de foie humain [Dean, 1991]. La formation de ce métabolite est importante depuis que celui-ci est impliqué dans l'augmentation de la toxicité de la cocaïne observée lorsque cocaïne et éthanol sont consommés de façon simultanée. Contrairement à l'étude du groupe de Figliomeni [Figliomeni, 1997], le norcocaéthylène qui pourrait être formé en présence d'éthanol via la transesterification de norcocaïne ou par N-déméthylation du cocaéthylène n'a pu être détecté. La mise en évidence de ce composé aurait été intéressante sachant que le métabolisme oxydatif du cocaéthylène serait également lié à une hépatotoxicité.

La production de métabolites de la cocaïne indiquent que les hépatocytes isolés en suspension de rat sont un bon modèle pour étudier les interactions entre cocaïne et éthanol. De plus, l'éthanol est rapidement métabolisé par les hépatocytes. En effet, il n'est jamais détecté à l'exception d'une concentration résiduelle moyenne de 5,3 mM (pour une concentration initiale de 20 mM d'éthanol) après 30 minutes d'incubation.

DISCUSSION GENERALE

La technique d'extraction phase solide, malgré sa lourdeur de mise en œuvre, offre la possibilité d'isoler et de concentrer la cocaïne, le cocaéthylène et huit de leurs métabolites respectifs de polarités variables.

L'analyse par chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse offre une grande sensibilité.

Notre étude confirme que l'addition d'éthanol à des cellules hépatiques de rat en suspension supplémentées en cocaïne résulte en la formation précoce de benzoylecgonine et de cocaéthylène, avec apparition retardée d'ecgonine méthyl ester, d'ecgonine et de norcocaïne. Elle montre également une métabolisation complète de la concentration initiale en éthanol.

PARTIE II

**ETUDE DES INTERACTIONS COCAINE-
ETHANOL SUR UN MODELE ENZYMATIQUE
FORTEMENT PURIFIE OBTENU A PARTIR
D'UN FOIE HUMAIN**

Considérant les interactions cocaïne / éthanol au niveau du foie humain, il est intéressant d'approfondir les effets de l'éthanol sur le métabolisme de la cocaïne médié par les carboxylesterases [EC 3.1.1.1] hépatiques.

Deux carboxylesterases hépatiques humaines, CEh-1 et CEh-2, ont été purifiées et partiellement caractérisées [Brzezinski, 1994. Pindel, 1997]. Ces enzymes présentent différentes spécificités pour la cocaïne : CEh-1 hydrolyse le groupe méthyl ester produisant la benzoylecgonine tandis que CEh-2 rompt le groupe benzoyl ester pour former l'ecgonine méthyl ester [Dean, 1991].

Il est supposé que plus de deux espèces moléculaires enzymatiques peuvent métaboliser la cocaïne au niveau du foie humain. Aussi nous nous proposons de purifier ces carboxylesterases afin d'étudier l'influence de l'éthanol sur le métabolisme de la cocaïne selon notre modèle reconstitué *in vitro*.

CHAPITRE I. MATERIELS ET METHODES

I. MATERIELS	94
I.1. PRODUITS CHIMIQUES	94
I.1.1. COMPOSES D'INTERET	94
I.1.2. AUTRES PRODUITS ET SOLUTIONS	95
I.2. MATERIEL	96
I.3. PREPARATION DE LA COLONNE D’AFFINITE	97
II. METHODES	97
II.1. CHOIX DES CONDITIONS EXPERIMENTALES	97
II.1.1. PRODUITS A TESTER	97
II.1.2. CONDITIONS D’INCUBATION	98
II.1.2.1. MATERIEL D’INCUBATION	98
II.1.2.2. MILIEUX D’INCUBATION	98
II.1.2.3. DUREE DE L’INCUBATION	98
II.2. PREPARATION D’UN SURNAGEANT HEPATIQUE HUMAIN	98
II.2.1. TISSU HUMAIN	98
II.2.2. PREPARATION D’UN EXTRAIT BRUT DE FOIE HUMAIN	99
II.2.3. CENTRIFUGATION	99
II.3. PROCEDURE DE PURIFICATION DES CARBOXYLESTERASES DE FOIE HUMAIN	99
II.4. TECHNIQUES ANALYTIQUES	101
II.4.1. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE EN PHASE INVERSE COUPLEE A UNE DETECTION PAR BARRETTES DE DIODE	101

II.4.2. ANALYSE DE L'ESPACE DE TETE PAR CHROMATOGRAPHIE PHASE GAZEUSE COUPLEE A UNE DETECTION PAR IONISATION DE FLAMME	108
II.4.2.1. GAMMES D'ETALONNAGE	110
II.4.2.2. DOSAGE DES ECHANTILLONS	112
II.4.2.3. APPLICATION D'UN FACTEUR DE CORRECTION	112
II.5. DETERMINATIONS DES ACTIVITES ENZYMATIQUES ET CHIMIQUES	112
II.5.1. ACTIVITES COCAINE METHYL ET BENZOYL ESTERASE	112
II.5.2. HYDROLYSE CHIMIQUE	113
III. ANALYSES STATISTIQUES	113

CHAPITRE I. MATERIELS ET METHODES

Le but de notre étude était de développer une procédure de purification simple afin d'identifier d'autres enzymes de la famille des carboxylesterases formes 1 et 2 de foie humain impliquées dans le métabolisme de la cocaïne. Par la suite, il s'agissait d'examiner l'influence de l'éthanol sur leurs activités respectives selon notre modèle reconstitué *in vitro*. La durée et l'ampleur des effets stimulants souhaités comme des effets toxiques de la cocaïne prise seule ou simultanément à de l'éthanol dépendent effectivement de ces activités enzymatiques.

Néanmoins, si ce modèle acellulaire peut apporter des informations utiles, ses performances restent inférieures au regard du modèle cellulaire pour l'établissement du risque toxicologique.

I. MATERIELS

I.1. PRODUITS CHIMIQUES

I.1.1. COMPOSES D'INTERET

Les ampoules de 1 mL dosées à 1 g / L (benzoylecgonine) et à 0,1 g / L (cocaéthylène) sont fournis par CIL Cambridge Isotope Laboratories. La (-)-cocaïne sous forme chlorhydrate

est fournie par Siegfried. L'acide benzoïque est produit par Merck. La lidocaïne provient de chez Sigma.

Les solutions de référence à 1 g / L, cocaïne et acide benzoïque, sont préparées dans l'acétonitrile et le méthanol respectivement. La solution de lidocaïne à 2 g / L est préparée dans le méthanol.

L'éthanol 99 % vient de chez Merck.

Les solutions étalons d'éthanol (0,5 ; 0,8 ; 1,5 et 3 g / L) sont également fournis par Merck. Elles sont conditionnées en ampoules de 1 mL.

I.1.2. AUTRES PRODUITS ET SOLUTIONS

Le tampon Krebs-Henseleit-bicarbonate de sodium (120 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 1,2 mM KH_2PO_4 , 1,2 mM MgSO_4 et 24 mM NaHCO_3) est ajusté à pH 7,4 par HCl 5 N. Ce tampon est utilisé comme milieu d'incubation des enzymes.

NaCl est fourni par Prolabo. KCl, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ et NaHCO_3 sont produits par Sigma.

Le tampon Krebs-Henseleit-bicarbonate de sodium pH 7,4 contenant 120 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM benzamidine, 1 % Triton X-100 et 20 % glycérol est utilisé comme tampon de préparation d'un extrait brut de foie humain.

NaCl, l'EDTA, la benzamidine·HCl, le Triton X-100 et le glycérol sont obtenus chez Sigma. Le DTT est fourni par Pharmacia Biotech.

Le tampon Tris 20 mM pH 7,4 contenant 2 mM EDTA, 1 mM DTT et 1 mM benzamidine (tampon A) est le tampon du surnageant hépatique.

Le Tris est fourni par Sigma.

Le tampon A + 1 M NaCl est le tampon d'élution (étape I de la procédure de purification).

Le tampon Tris 20 mM pH 7,4 contenant 1mM DTT, 1mM benzamidine, 0,5 M NaCl, 1 mM MnCl_2 et 1 mM CaCl_2 (tampon B) est le tampon des fractions actives isolées après l'étape I.

Le MnCl_2 et le $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sont fournis par Sigma.

Le tampon B + 0,5 M méthyl alpha-D-mannopyranoside est le tampon d'élution (étape II de la procédure de purification).

Le méthyl alpha-D-mannopyranoside est fourni par Sigma.

Le tampon NaH_2PO_4 50 mM pH 7,4 contenant 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM DTT et 1 mM benzamidine (tampon C) est le tampon des fractions actives isolées après l'étape II.

NaH_2PO_4 est obtenu chez Sigma.

La solution d'acide trichloracétique 5 % est une solution aqueuse.

L'acide trichloracétique est fourni par Merck.

La Concanavaline A Sépharose 4B (5 mL) est obtenue chez Pharmacia Biotech.

L'albumine bovine (fraction V) est fournie par Sigma.

Tous les solvants organiques de qualité analytique (acétonitrile, méthanol, acide chlorhydrique 30 %) sont fournis par Merck.

Tous les solvants et tampons sont préparés avec de l'eau traitée par un système de filtration Milli-Q de chez Millipore et filtrés sur Nylon Acrodisc® 0,2 µm de chez Gelman Sciences avant utilisation.

Le kit Bio-Rad de dosage des protéines [Lowry, 1951] provient de chez Sigma. L'albumine sérique de bœuf est utilisée comme standard.

I.2. MATERIEL

Le Waring blender (110 mL) en inox vient de chez Bioblock Scientific.

Les colonnes chromatographiques par échange d'anions (colonne Mono Q HR 5 / 5), par affinité (colonne Mono Q HR 5 / 20) et par filtration sur gel (colonne Superdex 200 PC 3,2 / 30) sont fournies par Pharmacia Biotech.

Les boucles d'injection du Smart System® (100 et 500 µL) sont fournies par Pharmacia Biotech.

Les concentrateurs Centricon® YM-30 sont fournis par Millipore.

Les tubes en polypropylène (50 mL) sont fournis par Sigma.

Les tubes Eppendorf sont fournis par Aldrich.

Les tubes Nalgène[®] (38 mL) pour ultracentrifugation sont fournis par Sigma.

Les plaques multipuits (96 puits) sont fournis par Sigma.

Les seringues hypodermiques Becton-Dickinson de 3 et 20 mL proviennent de chez Aldrich.

Les filtres Nylon Acrodisc[®] Gelman pour seringues ont des diamètres de 13 et 25 mm. Les pores sont de 0,2 µm. Ils proviennent de chez Aldrich.

Le système de purification (Econo System[®]) est fourni par Pharmacia Biotech.

Le système de micropurification (SMART System[®]) est fourni par Pharmacia Biotech.

I.3. PREPARATION DE LA COLONNE D’AFFINITE

Le gel d’affinité, soit la Concanavaline A Sépharose 4B, est coulé à l’aide d’un Econo System[®], à un débit de 1,2 mL / min.

La Concanavaline A Sépharose 4B est constituée de greffages glycoprotéiques.

II. METHODES

II.1. CHOIX DES CONDITIONS EXPERIMENTALES

II.1.1. PRODUITS A TESTER

Les produits à tester ont été discutés au Chapitre VII.

II.1.2. CONDITIONS D'INCUBATION

II.1.2.1. MATERIEL D'INCUBATION

S'agissant de tester un composé aussi volatil que l'éthanol et devant réaliser nos expérimentations en grand nombre, nous avons opté pour des tubes Eppendorf.

II.1.2.2. MILIEUX D'INCUBATION

De façon à rester homogène avec les expérimentations effectuées sur hépatocytes isolés de rat en suspension, nous avons choisi le tampon Krebs-Henseleit-bicarbonate de sodium pH 7,4 comme milieu d'incubation des enzymes. De plus, les composés de ce tampon n'apparaissent pas en CLHP / DBD et n'interfèrent pas avec les métabolites recherchés.

II.1.2.3. DUREE DE L'INCUBATION

La durée de l'incubation est déterminée par les cinétiques non enzymatiques.

II.2. PREPARATION D'UN SURNAGEANT HEPATIQUE HUMAIN

II.2.1. TISSU HUMAIN

Un spécimen de foie humain (plusieurs morceaux du lobe droit) est obtenu par autopsie. Le donneur (mâle, 53 ans), décédé par suicide, n'était connu ni pour usage de drogue ni pour consommation d'alcool. Plusieurs pièces sont congelées dans l'azote liquide et conservées à (-70)°C.

II.2.2. PREPARATION D'UN EXTRAIT BRUT DE FOIE HUMAIN

Environ 20 grammes de foie humain congelé sont homogénéisés à l'aide d'un Waring blender dans du tampon Krebs-Henseleit-bicarbonate de sodium pH 7,4 contenant 120 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM benzamidine, 1 % Triton X-100 et 20 % glycérol.

II.2.3. CENTRIFUGATION

Le surnageant hépatique est préparé par centrifugations successives (610, 6000 et 16100 x g ; chacune dure 10 minutes à 4°C). A chaque étape, les culots sont éliminés et les surnageants, réunis. L'ultracentrifugation (ultracentrifugeuse L8-70 de chez Beckmann) à 150000 x g s'effectue pendant 60 minutes à 4°C. Le surnageant hépatique est filtré (0,2 µm) et aliquoté en plusieurs fractions (1,5 mL) conservées à (-20)°C.

II.3. PROCEDURE DE PURIFICATION DES CARBOXYLESTERASES DE FOIE HUMAIN

La procédure globale de purification se déroule à l'aide d'un système de micropurification (SMART system®). Inspirée de la littérature [Brzezinski, 1994. Brzezinski, 1997], cette procédure requiert trois étapes : une chromatographie par échange d'anions (colonne Mono Q HR 5 / 5), une chromatographie d'affinité sur Concanavaline A Sépharose 4B (colonne Mono Q HR 5 / 20) et une filtration sur gel (colonne Superdex 200 PC 3,2 / 30). Le gel Superdex, gel composite à base d'agarose et de dextrane, permet de séparer des polypeptides et des protéines de masses moléculaires comprises entre 30 et 600 kDa. Les protéines sont détectées à 280 nm.

La procédure de purification comporte trois étapes : chromatographie par échange d'anions (étape I), chromatographie d'affinité (étape II) et filtration sur gel (étape III). Un schéma général de purification est exposé à la Figure 16.

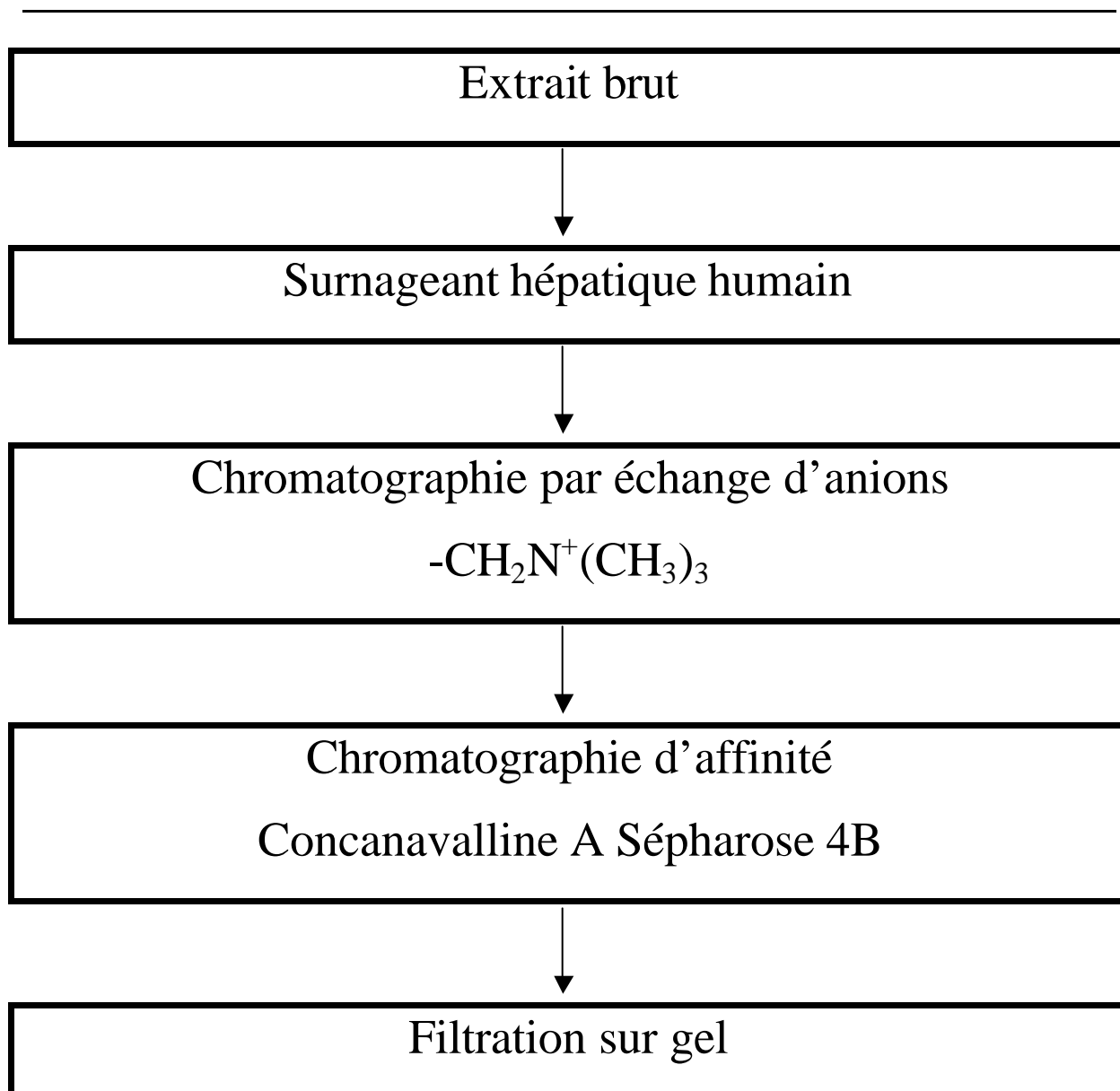


Figure 16. Schéma de micropurification des carboxylesterases de foie humain.

Le surnageant hépatique est dialysé contre 20 mM de tampon Tris pH 7,4 contenant 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM benzamidine (tampon A) et concentré sur Centricon® (membrane de 30 kDa). L'échantillon est déposé sur la colonne échangeuse d'anions équilibrée avec le tampon A. Les protéines liées sont éluées par 20 mL d'un gradient linéaire de tampon A à un (tampon A + 1 M NaCl), à un flux de 500 μL / min ; des fractions de 500 μL sont collectées. Cinquante pour cent (v / v) de glycérol sont additionnés à chaque fraction ; ces fractions sont ensuite stockées à $(-20)^\circ\text{C}$. Chaque fraction est testée pour sa capacité à hydrolyser la cocaïne ainsi que pour ses activités spécifiques méthyl et benzoyl esterase.

Les fractions actives sont reconstituées en pools et chacun de ceux-ci est dialysé contre 20 mM de tampon Tris pH 7,4 contenant 1mM DTT, 1mM benzamidine, 0,5 M NaCl, 1 mM MnCl_2 et 1 mM CaCl_2 (tampon B) et concentré sur Centricon® (membrane de 30 kDa). Les pools sont déposés sur la colonne d'affinité équilibrée avec le tampon B. Les protéines liées sont éluées par 20 mL d'un gradient linéaire de tampon B à un (tampon B + 0,5 M méthyl alpha-D-mannopyranoside), à un flux de 500 μL / min ; des fractions de 500 μL sont collectées. Cinquante pour cent (v / v) de glycérol sont additionnés à chaque fraction; ces fractions sont ensuite stockées à (-20)°C. Chaque fraction est testée pour sa capacité à hydrolyser la cocaïne ainsi que pour ses activités spécifiques méthyl et benzoyl esterase.

Les fractions actives sont reconstituées en pools et chacun de ceux-ci est dialysé contre 50 mM de tampon NaH_2PO_4 pH 7,4 contenant 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM DTT et 1 mM benzamidine (tampon C) et concentré sur Centricon® (membrane de 30 kDa). Les pools sont soumis à une chromatographie d'exclusion sur colonne Superdex 200 PC 3,2 / 30 équilibrée avec le tampon C. L'élution s'effectue à un flux de 40 μL / min et des fractions de 70 μL sont collectées. Cinquante pour cent (v / v) de glycérol sont additionnés à chaque fraction; ces fractions sont ensuite stockées à (-20)°C. Chaque fraction est testée pour sa capacité à hydrolyser la cocaïne ainsi que pour ses activités spécifiques méthyl et benzoyl esterase.

Bien que très rapides, les méthodes colorimétriques et enzymatiques manquent de spécificité. Aussi nous avons opté pour la CLHP / DBD afin d'analyser la cocaïne, la benzoylecgonine, l'acide benzoïque et le cocaéthylène ; l'analyse de l'espace de tête par CPG / DIF permet de quantifier l'éthanol.

II.4. TECHNIQUES ANALYTIQUES

II.4.1. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE EN PHASE INVERSE COUPLEE A UNE DETECTION PAR BARRETTES DE DIODE

La capacité à hydrolyser la cocaïne, les activités méthyl et benzoyl esterase ainsi que l'activité éthyl transférase du surnageant hépatique humain ou de chaque fraction obtenue lors de la procédure de purification sont testées par analyse respective de la cocaïne, de la benzoylecgonine, de l'acide benzoïque et du cocaéthylène par CLHP / DBD (HP 1090 Chromatographie liquide, Hewlett-Packard). La colonne est une LiChrospher® 60 RP-select B de chez Merck (25 cm de long ; 4 mm de diamètre interne ; particules de 5 µm) maintenue à 40°C. L'élution isocratique est utilisée pour la séparation [CH_3CN : KH_2PO_4 10 mM pH 3,0 ; 30 : 70]. Le flux est de 1,0 mL / min et la détection est fixée à 230 nm avec une fenêtre de \pm 10 nm.

Afin de bloquer la réaction, 500 µL d'acide trichloracétique 5 % sont additionnés au mélange réactionnel. Après centrifugation à 2700 x g pendant 10 minutes à 4°C, 800 µL de surnageant sont transférés dans un tube Eppendorf. Tous les surnageants sont ramenés à pH 6,0 par NaOH 5 N (15 µL) et 1 N (30 µL). 250 µL sont transférés dans un flacon en verre. Le standard interne est additionné (12,5 µL de lidocaïne à 2 g / L).

Un profil d'élution exposé à la Figure 17 indique la parfaite séparation des quatre molécules recherchées ainsi que du standard interne. Le pic apparaissant à 3,397 minutes est une contamination.

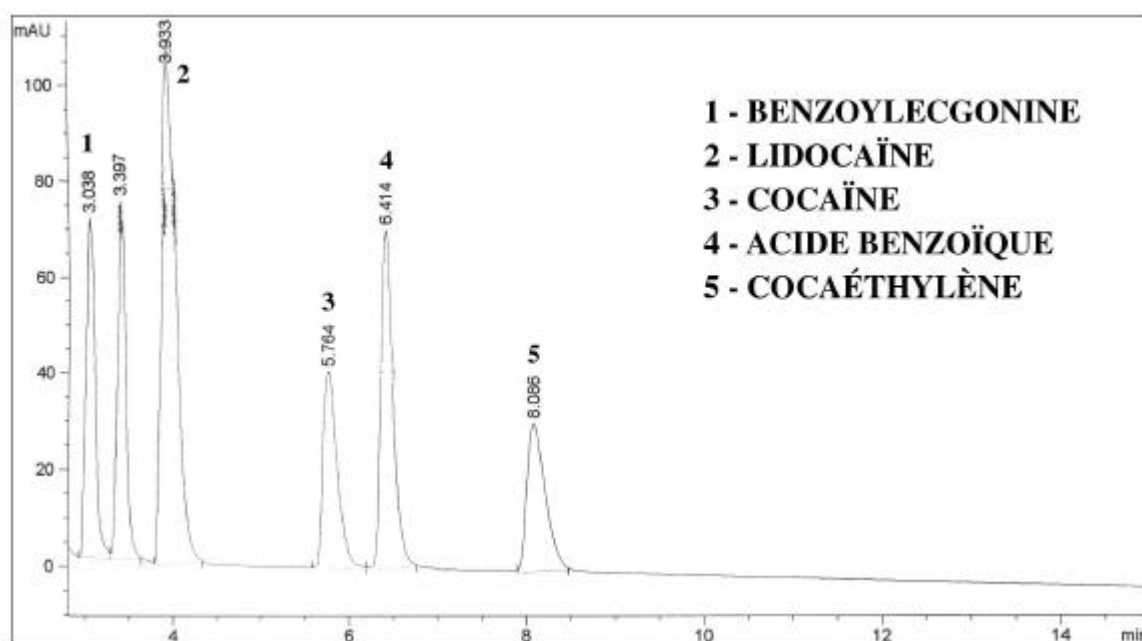
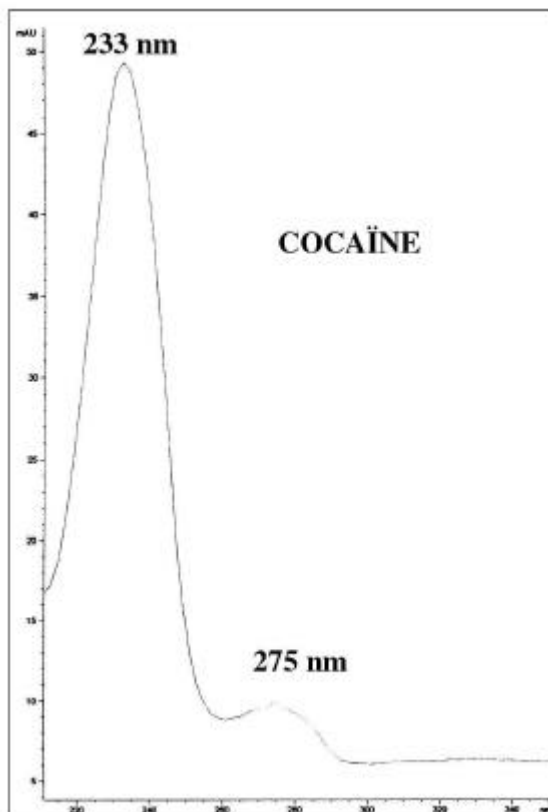
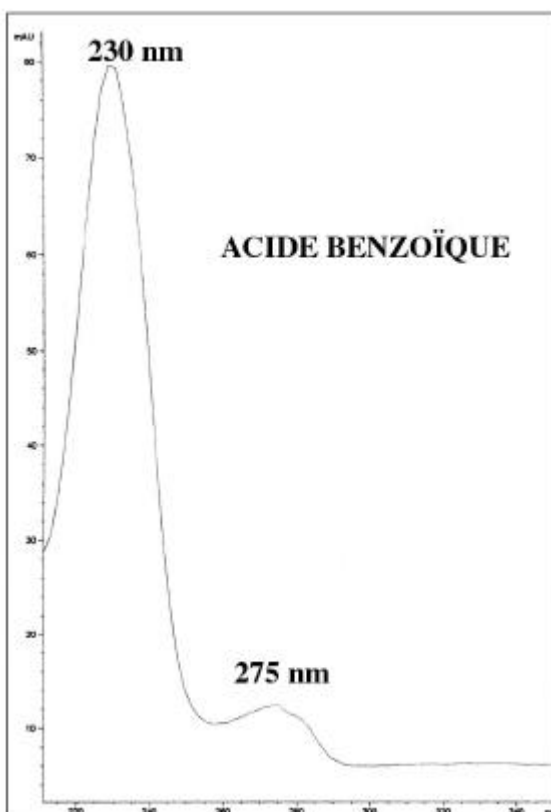
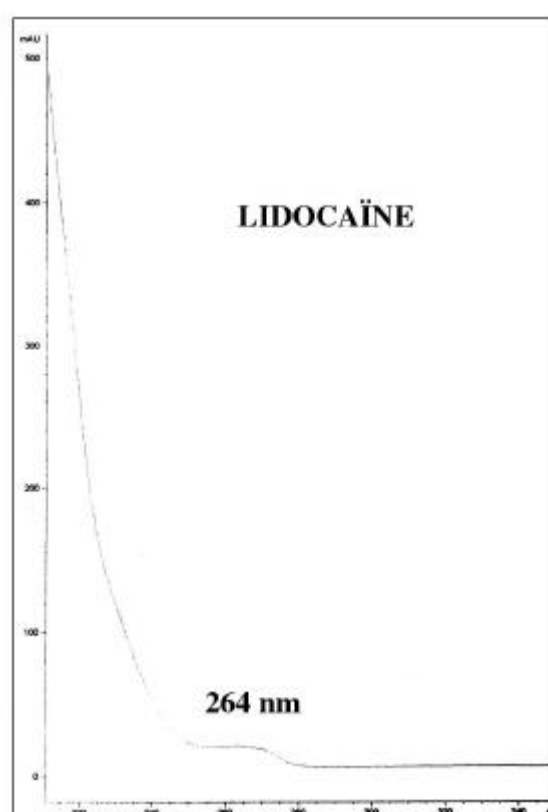
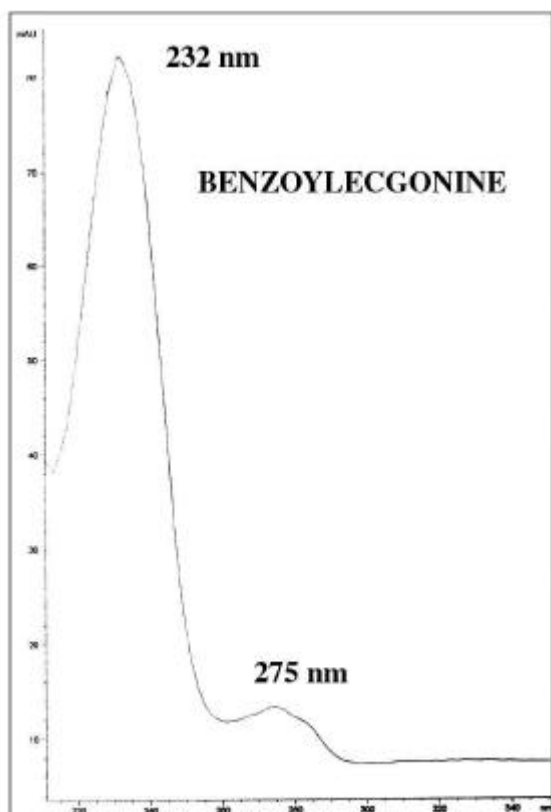


Figure 17. Analyse simultanée de la cocaïne, du cocaéthylène, de la benzoylecgonine et de l'acide benzoïque par CLHP / DBD.

Le point de concentration 30 mg / L est représenté.

1 : Benzoylecgonine ; 2 : Lidocaïne ; 3 : Cocaïne ; 4 : Acide benzoïque ; 5 : Cocaéthylène.

Chaque molécule d'intérêt est identifiée par son temps de rétention relatif et par son spectre UV. Les spectres UV sont présentés à la Figure 18. La formation d'ecgonine méthyl ester, qui n'absorbe pas dans l'UV, est détectée de façon indirecte par production d'acide benzoïque [Kim et Bornheim, 1997]. La longueur d'onde de 230 nm est celle choisie pour effectuer les quantifications.



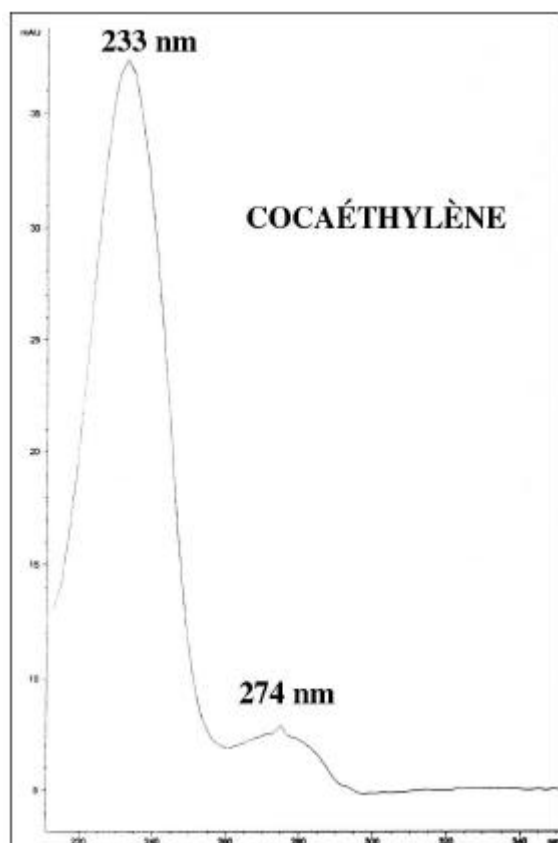


Figure 18. Spectres UV de la cocaïne, du cocaéthylène, de la benzoylecgonine, de l'acide benzoïque et de la lidocaïne par CLHP/ DBD.

Dans chaque milieu d'incubation, les concentrations de cocaïne, de cocaéthylène, de benzoylecgonine et d'acide benzoïque sont calculées par le biais de courbes de calibration réalisées selon le tableau ci-dessous (Tableau 12).

Concentrations (mg / L)	0	5	10	20	30	35	40
Cocaïne (1 g / L) (µL)	0	2,5	5	10	15	17,5	20
Cocaéthylène (1 g / L) (µL)	0	2,5	5	10	15	17,5	20
Benzoylecgonine (1 g / L) (µL)	0	2,5	5	10	15	17,5	20
Concentrations (mg / L)	0	3,1	6,1	12,3	18,4	21,5	24,5
Acide benzoïque (1 g / L) (µL)	0	1,6	3,1	6,2	9,2	10,8	12,3
Tampon Krebs-Henseleit-bicarbonate de sodium pH 7,4 (µL)	500	500	500	500	500	500	500

Tableau 12. Tableau expliquant la réalisation d'une gamme étalon.

Pour toute mesure, une gamme étalon est réalisée le jour même.

Ces gammes d'étalonnage sont linéaires entre 0 et 40 mg / L. Le standard interne, la lidocaïne, est à 100 mg / L.

Les courbes de calibration de la cocaïne, de la benzoylecgonine, de l'acide benzoïque et du cocaéthylène indiquent des coefficients de corrélation supérieurs à 0,99. Elles sont représentées à la Figure 19.

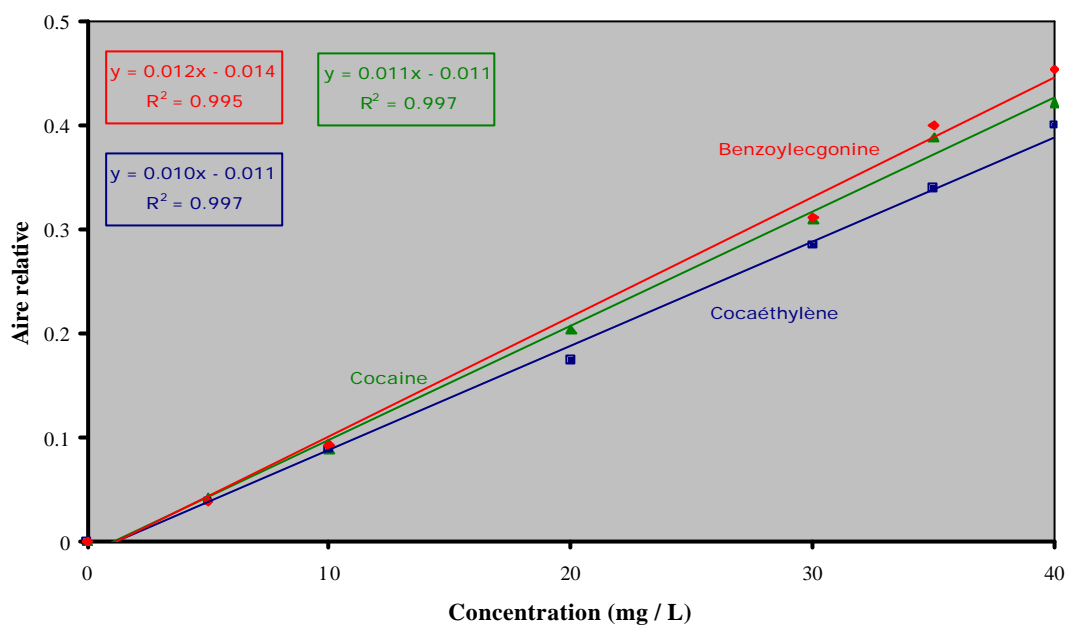


Figure 19a. Courbes de calibration de la cocaïne, de la benzoylecgonine et du cocaéthylène.

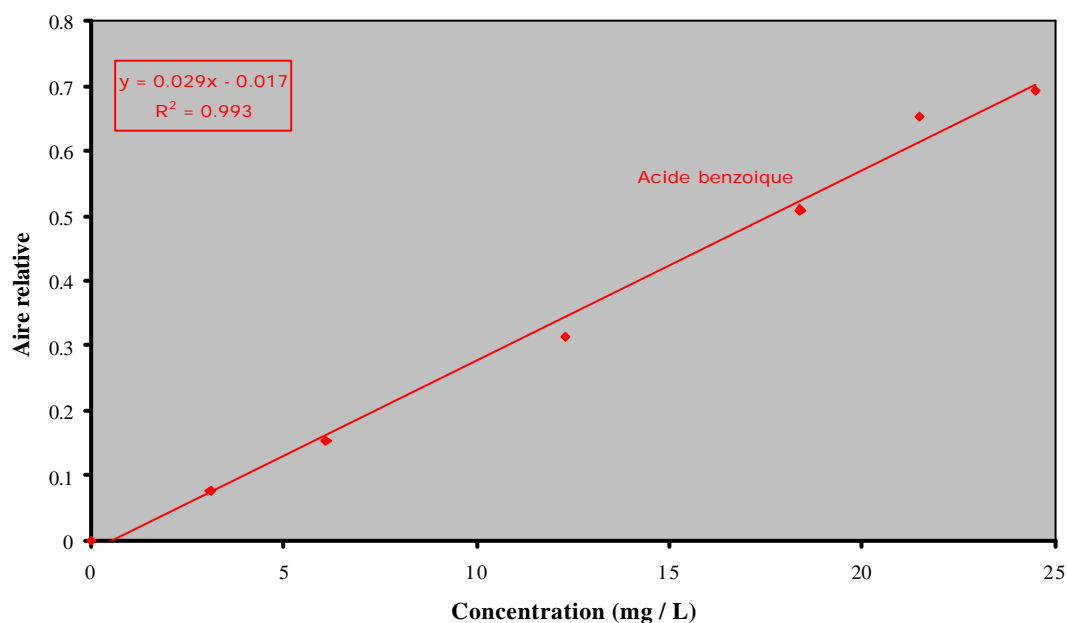


Figure 19b. Courbe de calibration de l'acide benzoïque.

Figure 19. Courbes de calibration de la cocaïne, du cocaéthylène, de la benzoylecgonine et de l'acide benzoïque.

II.4.2. ANALYSE DE L'ESPACE DE TÊTE PAR CHROMATOGRAPHIE PHASE GAZEUSE COUPLÉE À UNE DÉTECTION PAR IONISATION DE FLAMME

L'éthanol est dosé par analyse chromatographique de l'espace de tête.

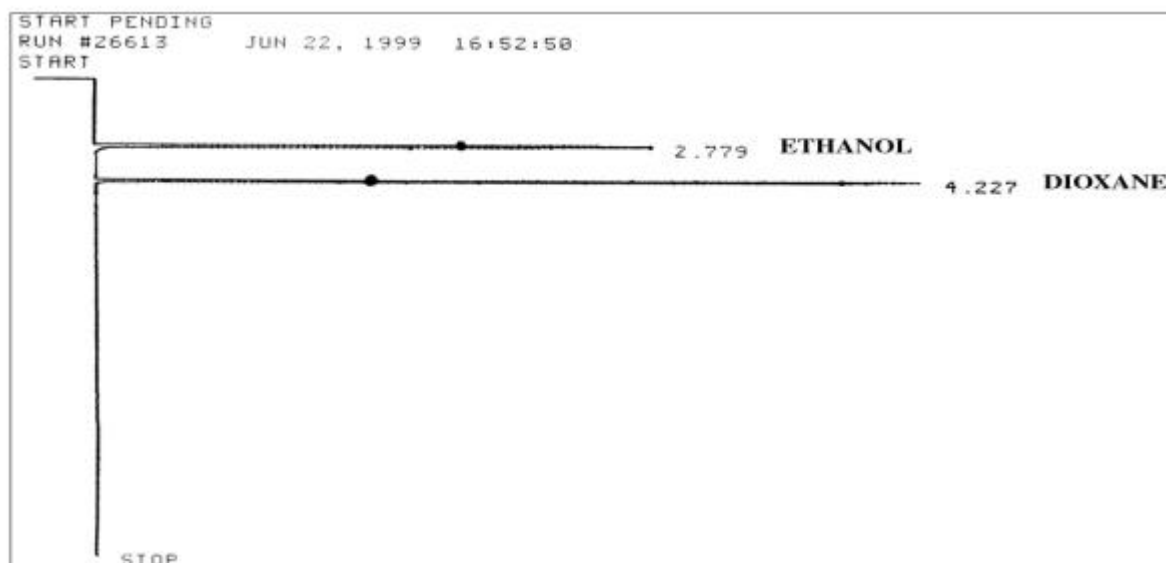
Deux méthodes utilisant chacune le dioxane (1 %) comme standard interne sont testées. Ces dernières sont celles appliquées au Laboratoire de Toxicologie Analytique de l'Institut Universitaire de Médecine Légale de Lausanne (Suisse). Les conditions opératoires de chacune de ces deux méthodes sont exposées dans le Tableau 13.

	Méthode 1	Méthode 2
Système d'injection	Hewlett-Packard 7694	Hewlett-Packard 7694
CPG / DIF	Hewlett-Packard 5890	Hewlett-Packard 5890
Température de l'injecteur	200°C	210°C
Température du détecteur	250°C	250°C
Programme de température	100°C pendant 6 min	50°C (1 min) à 180°C (10°C / min) (6 min)

Tableau 13. Paramètres utilisés pour l'analyse de l'espace de tête par CPG / DIF selon deux méthodes.

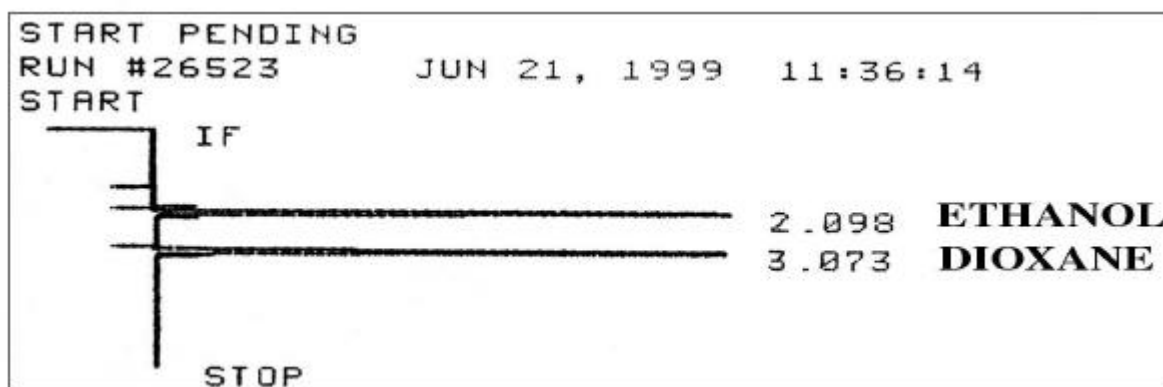
Quelque soit la méthode utilisée, l'éthanol et le dioxane sont clairement séparés et identifiés (Figure 20).

Méthode 1



2,779 min : Ethanol ; 4,227 min : Dioxane.

Méthode 2



2,098 min : Ethanol ; 3,073 min : Dioxane.

Figure 20. Chromatogrammes de l'éthanol obtenus par analyse de l'espace de tête par CPG/ DIF selon deux méthodes.

Le point de concentration 1,5 g / L est représenté.

II.4.2.1. GAMMES D'ETALONNAGE

Des solutions étalons d'alcool comprises entre 0 et 3 g / L sont utilisées.

La procédure est décrite ci-après.

Dans un flacon de 10 mL, mettre dans l'ordre :

-500 μL de solution éthanolique de concentration définie.

Noter la masse.

-100 μL de dioxane 1 % (p : v).

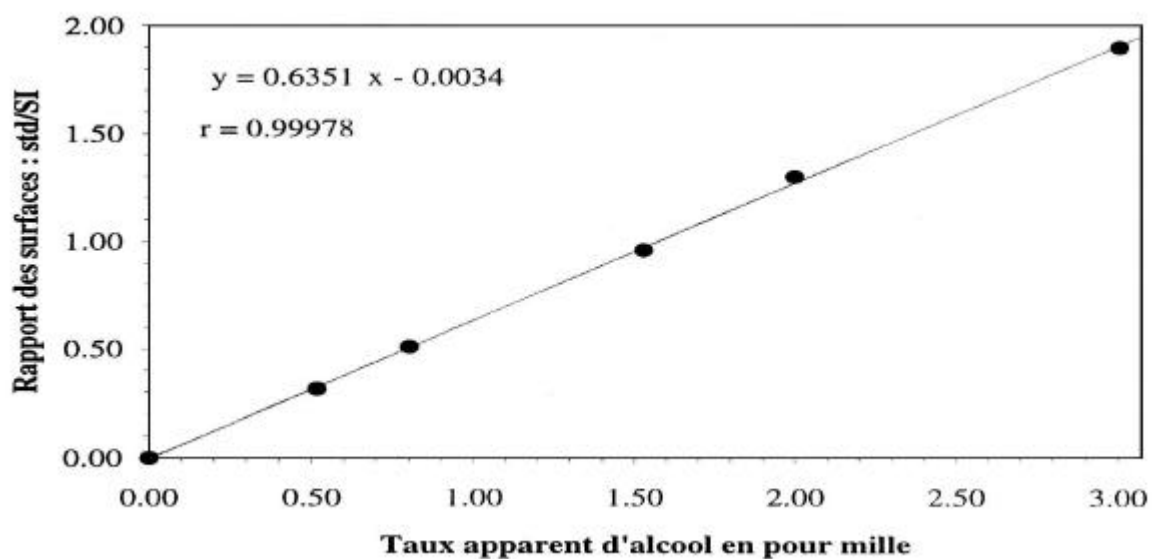
Noter la masse.

-500 μL H_2SO_4 1 M contenu dans une solution saturée de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Sceller immédiatement le flacon.

Les deux gammes d'étalonnage sont représentées à la Figure 21.

Méthode 1



Méthode 2

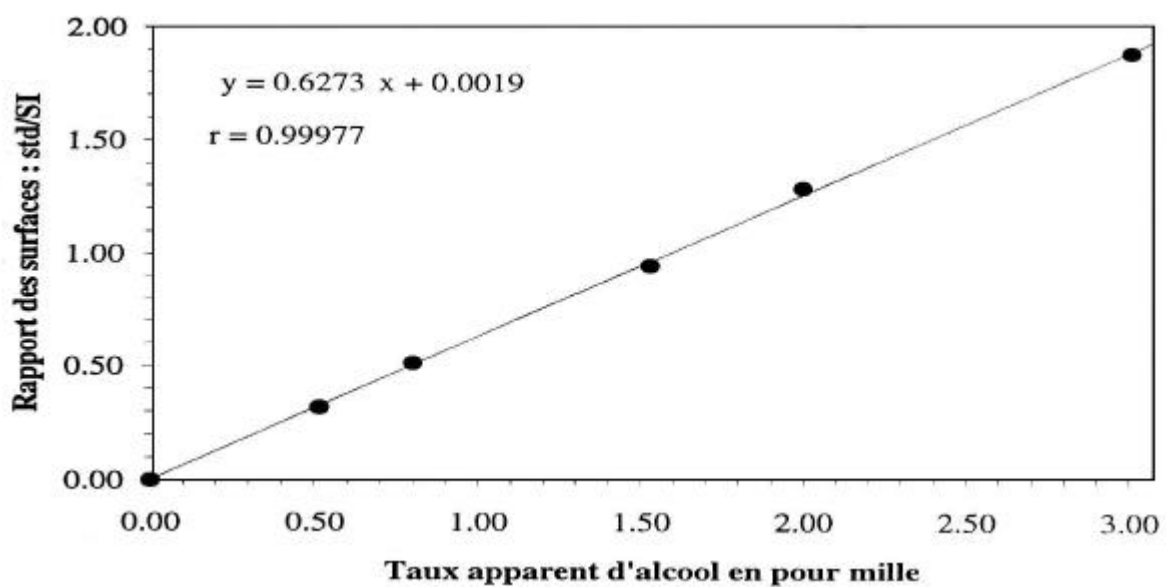


Figure 21. Courbes de calibration de l'éthanol obtenues par analyse de l'espace de tête par CPG / DIF selon deux méthodes.

Les droites de régression ont des pentes semblables, quelque soit la méthode utilisée.
Les coefficients de corrélation sont supérieurs à 0,999.

II.4.2.2. DOSAGE DES ECHANTILLONS

La procédure est décrite ci-après.

Dans un flacon de 10 mL, mettre dans l'ordre :

-500 µL d'échantillon.

Noter la masse.

-100 µL de dioxane 1% (p : v).

Noter la masse.

-500 µL H₂SO₄ 1 M contenu dans une solution saturée de (NH₄)₂SO₄.

Sceller immédiatement le flacon.

II.4.2.3. APPLICATION D'UN FACTEUR DE CORRECTION

Pour chaque calcul de la concentration en éthanol, un facteur de correction est appliqué afin de tenir compte des erreurs de pesée.

Facteur de correction = $(0,5 / \text{Masse réelle de l'échantillon}) \times (\text{Masse réelle du standard interne} / 0,1)$.

II.5. DETERMINATIONS DES ACTIVITES ENZYMATIQUES ET CHIMIQUES

II.5.1. ACTIVITES COCAINE METHYL ET BENZOYL ESTERASE

Dans le but de caractériser respectivement les activités méthyl et benzoyl esterase, les accumulations de benzoylecgonine et d'acide benzoïque (quantification indirecte d'ecgonine méthyl ester) sont déterminées. Le surnageant hépatique humain (500 µg de protéines), les pools enzymatiques obtenus après chromatographie par échange d'anions (10 µg de protéines) ou après chromatographie d'affinité et les carboxylesterases fortement purifiées (1 µg de protéines) sont combinés avec 116 µM de cocaïne dans du tampon Krebs-Henseleit-bicarbonate de sodium pH 7,4 (500 µL de volume réactionnel total) et incubés pendant 60 minutes à 37°C. La réaction est arrêtée par un volume égal d'acide trichloracétique 5 %. Les protéines précipitées sont éliminées par centrifugation (2700 x g pendant 10 minutes à 4°C). Tous les surnageants (800 µL) sont ramenés à pH 6,0 par NaOH 5 N (15 µL) et 1 N (30 µL). 250 µL sont transférés dans un flacon en verre. Le standard interne est additionné (12,5 µL de lidocaïne à 2 g / L). Afin d'étudier les effets potentiellement toxiques de l'éthanol, une procédure semblable est conduite en additionnant 40 mM d'éthanol. Pour chaque essai, trois réplicats sont réalisés.

Les concentrations protéiques sont déterminées avec le test Bio-Rad utilisant l'albumine sérique de bœuf comme standard, selon la méthode de Lowry [Lowry, 1951].

II.5.2. HYDROLYSE CHIMIQUE

L'hydrolyse spontanée de la cocaïne seule ou en présence d'éthanol en benzoylecgonine et méthanol est déterminée par incubation sans enzyme à 37°C dans du tampon Krebs-Henseleit-bicarbonate de sodium pH 7,4, pour des temps de 30, 60, 120, 180 et 240 minutes.

II. ANALYSES STATISTIQUES

Les comparaisons statistiques sont effectuées en utilisant le test de Mann-Whitney. Le seuil de significativité est défini lorsque $p < 0,05$ ou 0,1. Les valeurs représentent la moyenne \pm ESM (trois réplicats).

CHAPITRE II. RESULTATS

I. RESULTATS	114
I.1. HYDROLYSE CHIMIQUE	114
I.2. ACTIVITES COCAINE METHYL ET BENZOYL ESTERASE	115
I.2.1. CARACTERISATION DES ACTIVITES COCAINE METHYL ET BENZOYL ESTERASE DANS LE SURNAGEANT HEPATIQUE HUMAIN. EFFETS D'UN INHIBITEUR POTENTIEL, L'ETHANOL	115
I.2.2. ACTIVITES COCAINE METHYL ET BENZOYL ESTERASE DES CARBOXYLESTERASES PARTIELLEMENT OU FORTEMENT PURIFIEES (ETAPES I, II ET III). EFFETS D'UN INHIBITEUR POTENTIEL, L'ETHANOL	118
I.2.2.1. ACTIVITES COCAINE METHYL ET BENZOYL ESTERASE DES CARBOXYLESTERASES PARTIELLEMENT PURIFIEES APRES CHROMATOGRAPHIE PAR ECHANGE D'ANIONS (ETAPE I). EFFETS D'UN INHIBITEUR POTENTIEL, L'ETHANOL	118
I.2.2.2. ACTIVITES COCAINE METHYL ET BENZOYL ESTERASE DES CARBOXYLESTERASES PARTIELLEMENT PURIFIEES APRES CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE (ETAPE II)	122
I.2.2.3. ACTIVITES COCAINE METHYL ET BENZOYL ESTERASE DES CARBOXYLESTERASES FORTEMENT PURIFIEES APRES CHROMATOGRAPHIE PAR FILTRATION SUR GEL (ETAPE III). EFFETS D'UN INHIBITEUR POTENTIEL, L'ETHANOL	123
II. DISCUSSION	126

I. RESULTATS

I.1. HYDROLYSE CHIMIQUE

D'après nos résultats, 20,2 % de cocaïne sont dégradés par hydrolyse spontanée dans du tampon Krebs-Henseleit-bicarbonate de sodium pH 7,4 à 37°C, en 60 minutes (Figure 22a). La concentration de benzoylecgonine formée spontanément est de 5,3 mM durant ce même temps.

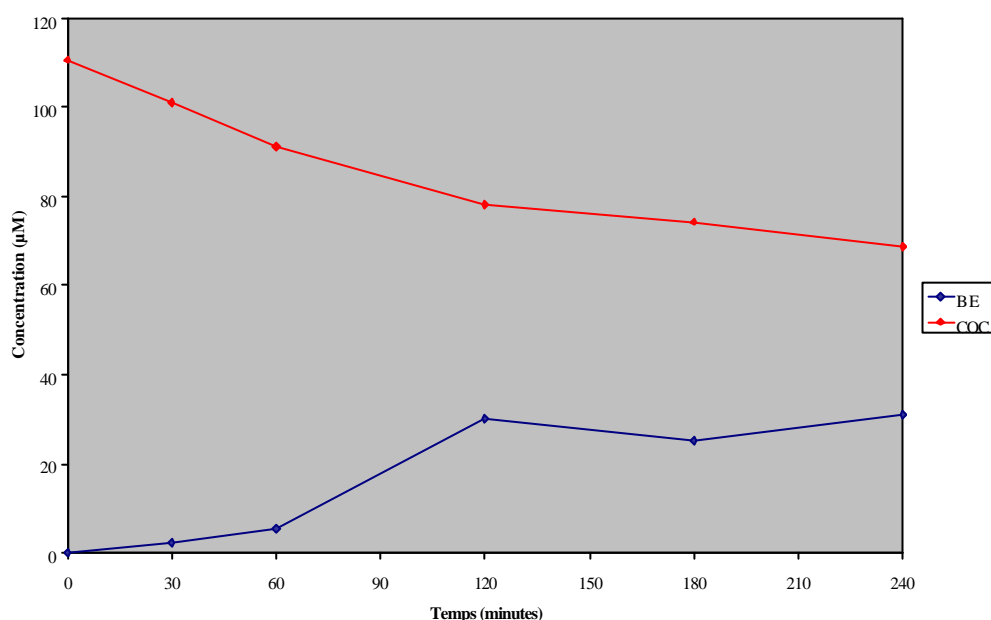


Figure 22a. Hydrolyse chimique de la cocaïne.

La cocaïne (116 µM) est incubée pendant 30, 60, 120, 180 et 240 minutes dans du tampon Krebs-Henseleit-bicarbonate de sodium pH 7,4 à 37°C. La cocaïne est analysée par CLHP / DBD en phase inverse.

Les valeurs représentent une seule expérimentation.

De façon surprenante, en présence d'éthanol (Figure 22b), la cocaïne ne subit pas d'hydrolyse spontanée dans du tampon Krebs-Henseleit-bicarbonate de sodium pH 7,4 à 37°C, en 60 minutes. Néanmoins, une concentration de 5,2 mM de benzoylecgonine apparaît.

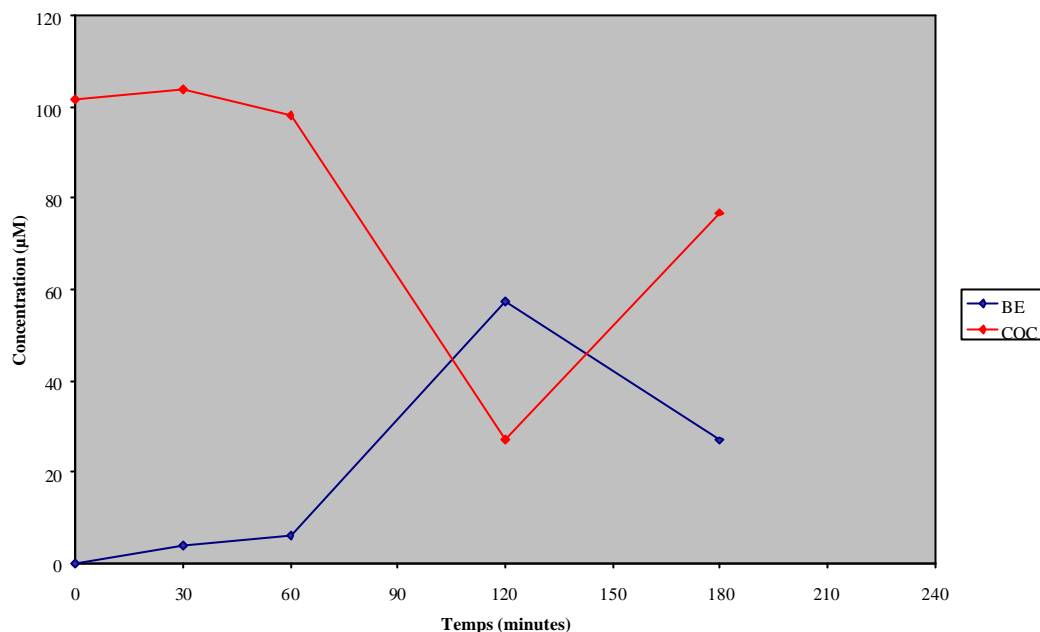


Figure 22b. Hydrolyse chimique de la cocaïne en présence d'éthanol.

La cocaïne (116 µM) est incubée en présence d'éthanol (40 mM) pendant 30, 60, 120, 180 et 240 minutes dans du tampon Krebs-Henseleit-bicarbonate de sodium pH 7,4 à 37°C. La cocaïne est analysée par CLHP / DBD en phase inverse.

Les valeurs représentent une seule expérimentation.

Figure 22. Hydrolyse chimique de la cocaïne seule ou en présence d'éthanol.

Dans tous nos résultats exprimés, les quantités de cocaïne dégradée et de benzoyllecgonine formée spontanément en 60 minutes à 37°C sont déduites.

I.2. ACTIVITES COCAINE METHYL ET BENZOYL ESTERASE

I.2.1. CARACTERISATION DES ACTIVITES COCAINE METHYL ET BENZOYL ESTERASE DANS LE SURNAGEANT HEPATIQUE HUMAIN. EFFETS D'UN INHIBITEUR POTENTIEL, L'ETHANOL

Les expérimentations sont conduites en utilisant un surnageant 150000 x *g* de foie humain contenant des esterase capables de métaboliser la cocaïne en benzoylecgonine et ecgonine méthyl ester [Dean, 1991].

Les concentrations en cocaïne et éthanol sont fixées à 116 μ M et 40 mM respectivement, valeurs voisines des K_m établis en utilisant une cocaïne méthyl esterase purifiée de foie humain (CEh-1) [Brzezinski, 1994]. L'addition d'éthanol au mélange d'incubation du surnageant hépatique contenant de la cocaïne résulte en une chute de 45 % de la dégradation de celle-ci (Figure 23) et diminue légèrement mais de façon significative ($21,18 \pm 1,315$ *versus* $16,67 \pm 0,546$ nmol / h \cdot mg ; $p = 0,05$) le taux de benzoylecgonine formée (Figure 24). Aucune variation significative n'est observée dans l'activité benzoyl esterase. Selon nos conditions expérimentales *in vitro*, et avec une coincubation d'éthanol, aucune production de cocaéthylène (mesure de l'activité cocaïne éthyl transferase) n'est mise en évidence. Cependant, une consommation de 11,6 % d'alcool éthylique *versus* contrôle est observée.

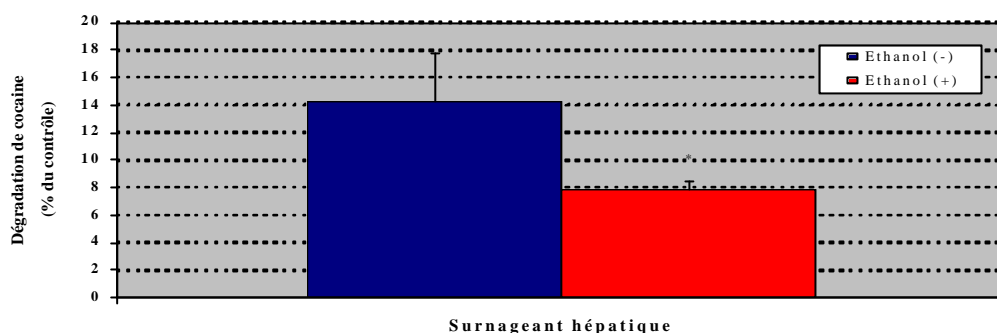


Figure 23. Effets de l'éthanol sur la dégradation enzymatique de la cocaïne au niveau d'un surnageant de foie humain.

La cocaïne (116 μM) est incubée pendant 60 minutes avec un surnageant 150000 x g (500 μg de protéines) venant d'un spécimen de foie humain, avec ou sans éthanol (40 mM). La cocaïne est analysée par CLHP / DBD en phase inverse.

Les contrôles sont obtenus en incubant de la cocaïne avec ou sans éthanol, sans enzyme.

Les valeurs représentent la moyenne \pm ESM (trois réplicats). *Significativement différent de l'échantillon sans éthanol en utilisant le test de Mann-Whitney ($p < 0,1$).

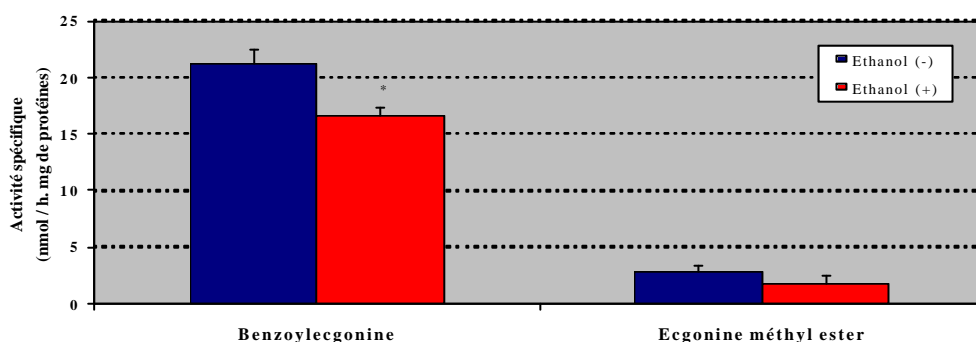


Figure 24. Effets de l'éthanol sur les activités cocaïne méthyl et benzoyl esterase au niveau d'un surnageant hépatique humain.

La cocaïne (116 μM) est incubée pendant 60 minutes avec un surnageant 150000 x g (500 μg de protéines) venant d'un spécimen de foie humain, avec ou sans éthanol (40 mM). Les productions de benzoylécgonine et d'acide benzoïque (quantification indirecte d'ecgonine méthyl ester) sont analysées par CLHP / DBD en phase inverse.

Les contrôles sont obtenus en incubant de la cocaïne avec ou sans éthanol, sans enzyme.

Les valeurs représentent les moyennes \pm ESM (trois réplicats). *Significativement différent de l'échantillon sans éthanol en utilisant le test de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

I.2.2. ACTIVITES COCAINE METHYL ET BENZOYL ESTERASE DES CARBOXYLESTERASES PARTIELLEMENT OU FORTEMENT PURIFIEES (ETAPES I, II ET III). EFFETS D'UN INHIBITEUR POTENTIEL, L'ETHANOL

Dans le but de séparer les esterase de foie humain obtenu par autopsie, une procédure de purification utilisant un système de micropurification (SMART System[®]) est appliquée. Les carboxylesterases sont purifiées à partir d'un surnageant 150000 x g en utilisant une chromatographie par échange d'anions (étape I), une chromatographie d'affinité (étape II) et une chromatographie d'exclusion (étape III).

Les effets potentiels de l'éthanol sur l'hydrolyse enzymatique de la cocaïne (par les activités spécifiques cocaïne méthyl et benzoyl esterase) sont également étudiés en utilisant soit un des trois pools enzymatiques séparément, soit les fractions 1 et 2.

I.2.2.1. ACTIVITES COCAINE METHYL ET BENZOYL ESTERASE DES CARBOXYLESTERASES PARTIELLEMENT PURIFIEES APRES CHROMATOGRAPHIE PAR ECHANGE D'ANIONS (ETAPE I). EFFETS D'UN INHIBITEUR POTENTIEL, L'ETHANOL

Après une chromatographie par échange d'anions, la capacité de chaque fraction à métaboliser la cocaïne produisant la benzoylecgonine et l'acide benzoïque (i.e. la capacité à exprimer respectivement les activités méthyl et benzoyl esterase) est déterminée par CLHP / DBD en phase inverse. Cette chromatographie par échange d'anions est reproductible sur quatre passages. Il est à noter que l'hémoglobine est vraisemblablement éliminée durant les cinq premières minutes. Les activités méthyl et benzoyl esterase sont éluées en trois pics à environ 250, 500 et 650 mM NaCl (Figure 25). Les pools enzymatiques 1, 2 et 3 sont constitués et utilisés pour la suite de la purification.

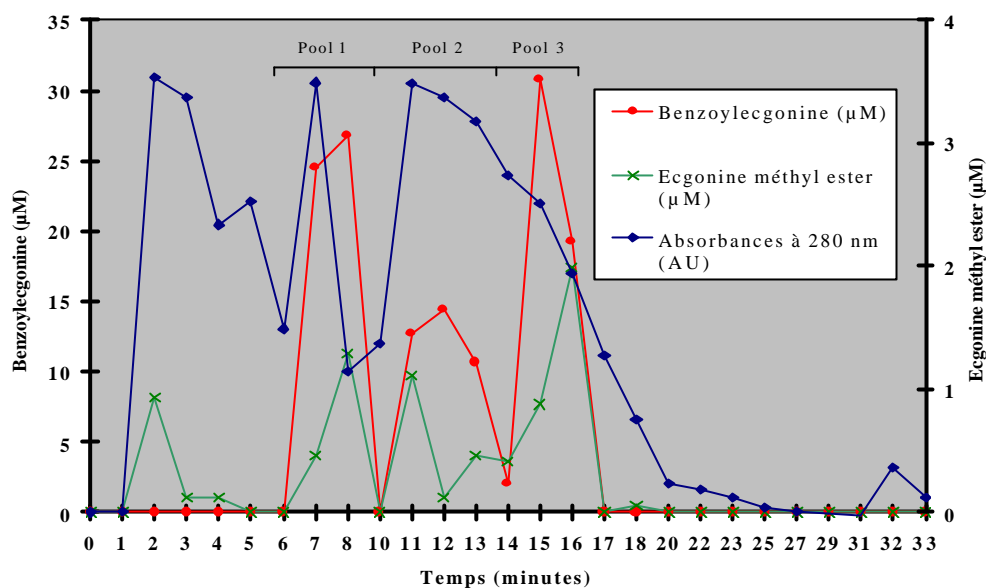


Figure 25. Profil d'élution obtenu après chromatographie par échange d'anions.

Colonne : Mono Q HR 5 / 5.

Concentration protéique : 70 g / L.

Volume injecté : 500 μL.

Chacun d'eux présente une capacité significativement différente à hydrolyser la cocaïne (Figure 26) et possède des activités méthyl et benzoyl esterase simultanées (Figure 27). Les pools enzymatiques 2 et 3 sont significativement 2 et 3 fois plus actifs que le pool enzymatique 1 considérant la dégradation de cocaïne ($p = 0,04$ et $0,03$, respectivement ; Figure 26), tandis que les activités spécifiques cocaïne méthyl esterase dans les pools enzymatiques 1 ($1,212 \pm 0,008 \mu\text{mol} / \text{h} \cdot \text{mg}$), 2 ($1,389 \pm 0,058 \mu\text{mol} / \text{h} \cdot \text{mg}$) et 3 ($2,081 \pm 0,161 \mu\text{mol} / \text{h} \cdot \text{mg}$) sont significativement différentes (pool 1 *versus* pool 2, $p = 0,07$; pool 2 *versus* pool 3, $p = 0,09$; pool 1 *versus* pool 3, $p = 0,07$; Figure 27A). L'incubation du pool enzymatique 3 avec la cocaïne résulte en la formation de benzoylécgonine avec la plus forte activité spécifique. Considérant la production d'ecgonine méthyl ester (Figure 27B), des différences significatives sont également observées entre chacun des trois pools enzymatiques (pool 1 *versus* pool 3, $p = 0,01$; pool 2 *versus* pool 3, $p = 0,01$). L'activité benzoyl esterase caractérisant le pool enzymatique 2 est en effet 2,5 fois supérieure à celle présente dans le pool enzymatique 3. Sous nos conditions *in vitro*, le pool enzymatique 3 présente donc l'activité spécifique cocaïne méthyl esterase ($2,081 \pm 0,161 \mu\text{mol} / \text{h} \cdot \text{mg}$) la plus élevée

associée à la plus faible activité cocaïne benzoyl esterase ($0,099 \pm 0,022 \mu\text{mol} / \text{h} \cdot \text{mg}$). Ces résultats sont, concernant ce pool, en accord avec le fait que la benzoylecgonine est le métabolite majeur de la cocaïne.

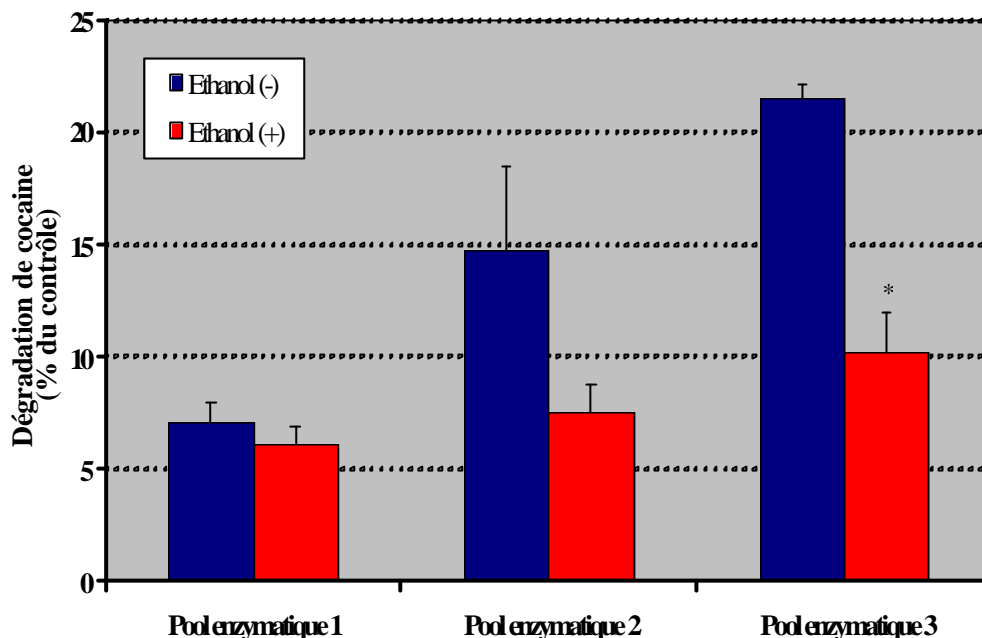


Figure 26. Effets de l'éthanol sur la dégradation enzymatique de la cocaïne en présence de carboxylesterases partiellement purifiées (étape I).

La cocaïne ($116 \mu\text{M}$) est incubée pendant 60 minutes avec chacun des trois pools enzymatiques séparés par chromatographie par échange d'anions ($10 \mu\text{g}$ de protéines), avec ou sans éthanol (40 mM). La cocaïne est quantifiée par CLHP / DBD en phase inverse.

Les contrôles sont obtenus en incubant de la cocaïne avec ou sans éthanol, sans enzyme.

Les valeurs représentent les moyennes \pm ESM (trois réplicats). *Significativement différent de l'échantillon sans éthanol en utilisant le test de Mann-Whitney ($p < 0,1$).

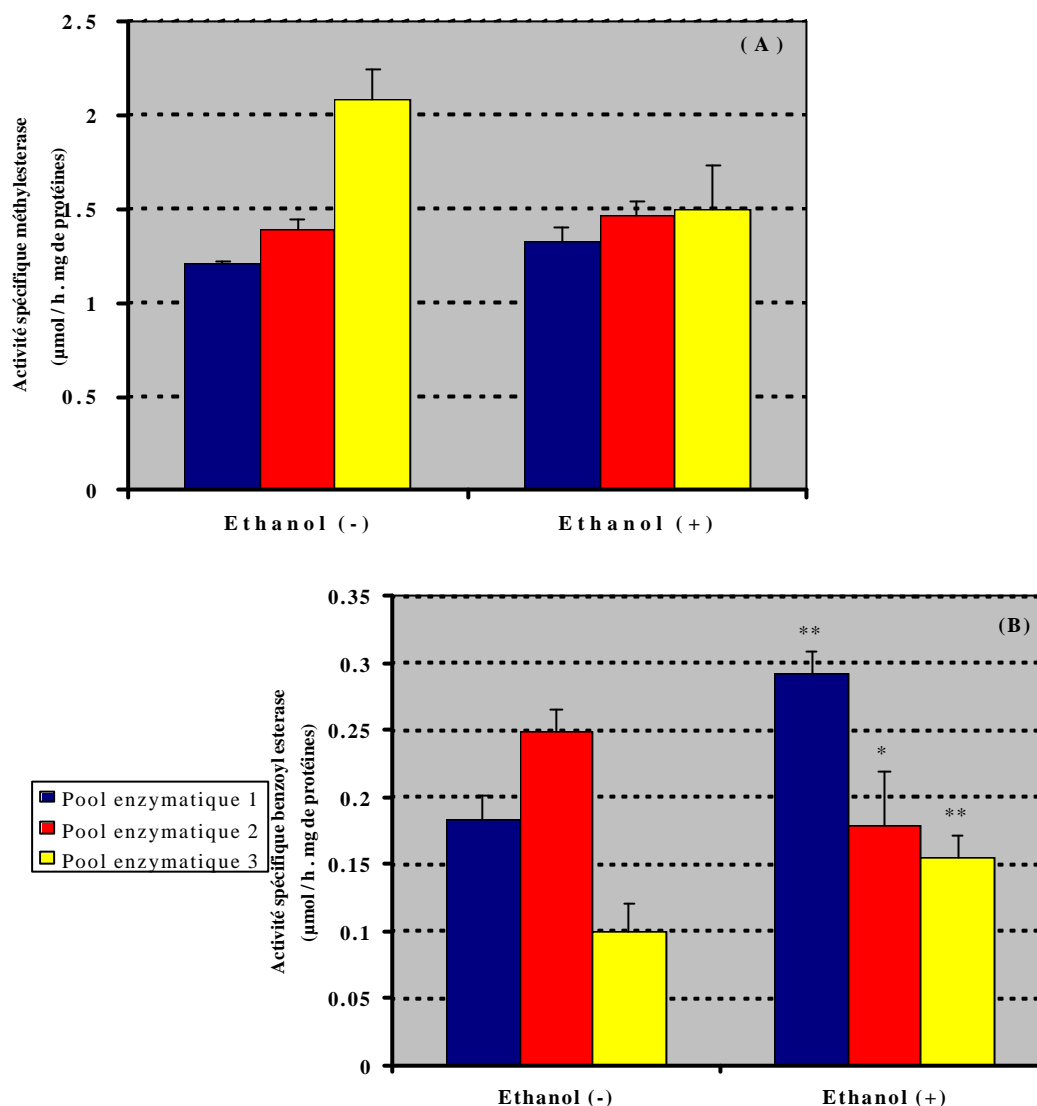


Figure 27. Effets de l'éthanol sur les activités cocaïne méthyl et benzoyl esterase en présence de carboxylesterases partiellement purifiées (étape I).

La cocaïne (116 μM) est incubée pendant 60 minutes avec chacun des trois pools enzymatiques séparés par chromatographie par échange d'anions (10 μg de protéines), avec ou sans éthanol (40 mM). Les productions de benzoylecgonine (A) et d'acide benzoïque (quantification indirecte d'ecgonine méthyl ester ; B) sont analysées par CLHP / DBD en phase inverse.

Les contrôles sont obtenus en incubant de la cocaïne avec ou sans éthanol, sans enzyme.

Les valeurs représentent les moyennes \pm ESM (trois réplicats). *Significativement différent d'un échantillon sans éthanol par le test de Mann-Whitney ($p < 0,05$). **Significativement différent d'un échantillon sans éthanol par le test de Mann-Whitney ($p < 0,1$).

Les effets potentiels de l'éthanol sur l'hydrolyse enzymatique de la cocaïne (par les activités spécifiques cocaïne méthyl et benzoyl esterase) sont également étudiés en utilisant un des trois pools enzymatiques séparément. Si l'hydrolyse de la cocaïne est insensible à la présence d'éthanol dans le pool enzymatique 1, l'inhibition se produit de façon significative pour le pool 3 (Figure 26 ; par exemple, $p = 0,08$ pour le pool 3). Ceci n'est pas surprenant puisque la plus grande activité spécifique méthyl esterase est exprimée dans le pool enzymatique 3 ; cette activité est diminuée de 28 % par la présence d'éthanol (Figure 27A). Le même phénomène est observé avec le pool enzymatique 2, lequel est caractérisé par la plus grande activité benzoyl esterase et inhibé de façon similaire par l'éthanol (Figure 27B ; $p = 0,05$). Au contraire, les activités benzoyl esterase des pools enzymatiques 1 et 3 sont significativement augmentées par l'éthanol (Figure 28B ; activation de 37 % et 36 % respectivement ; $p = 0,08$ dans les deux cas). Par conséquent, le rapport spécifique caractérisant le pool enzymatique 3 (activité méthyl esterase/ activité benzoyl esterase) est particulièrement diminué par l'éthanol (9,7 *versus* 21), tandis que le même rapport est moins affecté dans le pool enzymatique 1 (4,6 *versus* 6,6). Les espèces enzymatiques constitutives de ces pools apparaissent donc comme des entités moléculaires distinctes, ceci étant suggéré par la plus grande sensibilité du pool enzymatique 3 à une inhibition par l'éthanol, mesuré par l'hydrolyse globale de la cocaïne (Figure 26).

I.2.2.2. ACTIVITES COCAINE METHYL ET BENZOYL ESTERASE DES CARBOXYLESTERASES PARTIELLEMENT PURIFIEES APRES CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE (ETAPE II)

Chacun des trois pools enzymatiques obtenus après chromatographie par échange d'anions est soumis à une chromatographie d'affinité sur Concanavaline A Sépharose 4B. Celle-ci ne permet pas de séparer la cocaïne méthyl esterase de la cocaïne benzoyl esterase, quelque soit le pool enzymatique obtenu après chromatographie par échange d'anions.

I.2.2.3. ACTIVITES COCAINE METHYL ET BENZOYL ESTERASE DES CARBOXYLESTERASES FORTEMENT PURIFIEES APRES CHROMATOGRAPHIE PAR FILTRATION SUR GEL (ETAPE III). EFFETS D'UN INHIBITEUR POTENTIEL, L'ETHANOL

Le pool enzymatique élué avec une faible force ionique (pool 1 après chromatographie par échange d'anions) est ensuite purifié sur colonne Superdex 200 PC 3,2 / 30 (Figure 28).

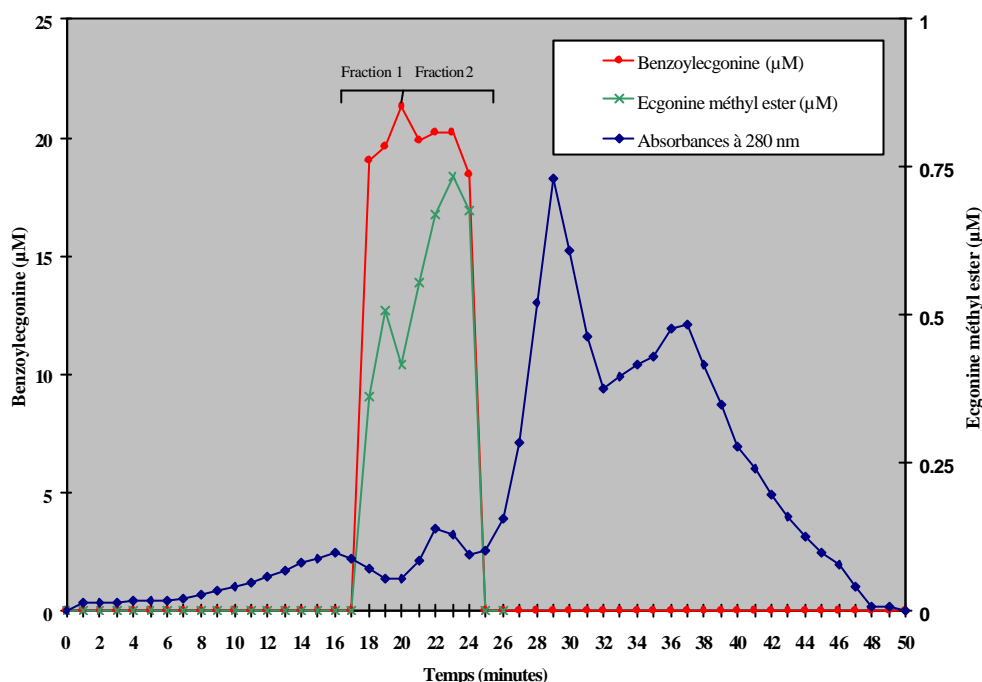


Figure 28. Profil d'élution obtenu après filtration sur gel.

Colonne : Superdex 200 PC 3,2 / 30.

Concentration protéique : 15 g / L.

Volume injecté : 70 µL.

Deux fractions enzymatiques ont pu être séparées selon leurs masses moléculaires respectives (de façon similaire, aucun résultat n'a pu être obtenu après application des pools 2 et 3 sur la même colonne, ceci étant dû aux faibles quantités de protéines disponibles) et sur la base de l'activité benzoyl esterase (Figure 28). Chacune présente la capacité d'hydrolyser la cocaïne (Figure 29). Considérant la capacité à hydrolyser les deux groupes ester de la cocaïne simultanément, les deux esterases présentent des propriétés catalytiques comparables (Figure 30). Cependant, il doit être souligné que le rapport (activité spécifique méthyl esterase /

activité spécifique benzoyl esterase) présenté par la fraction enzymatique 2 est le plus grand (9,3 versus 7,4).

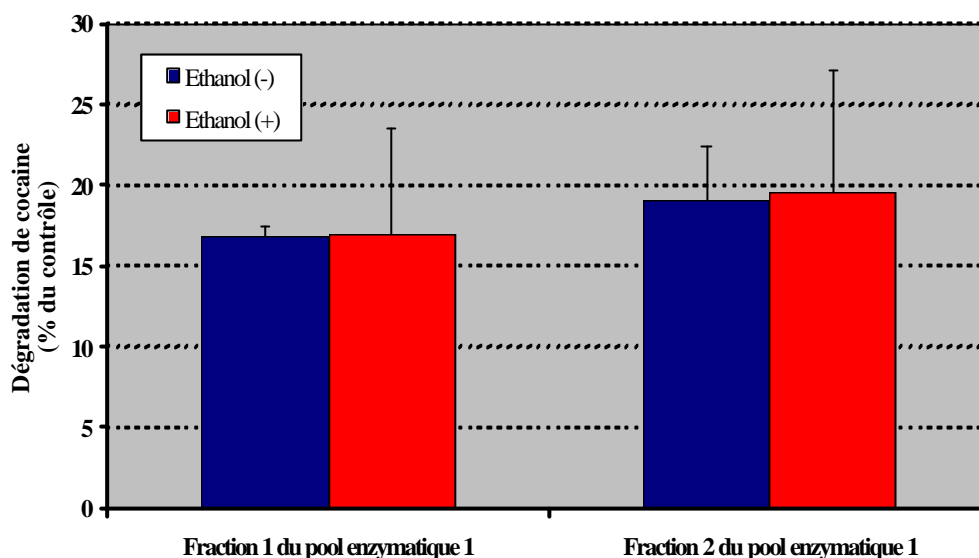


Figure 29. Effets de l'éthanol sur la dégradation enzymatique de la cocaïne en présence de carboxylesterases fortement purifiées (étape III).

La cocaïne (116 μM) est incubée pendant 60 minutes avec chacune des deux fractions enzymatiques séparées après filtration sur gel (1 μg de protéines), avec ou sans éthanol (40 mM). La cocaïne est analysée par CLHP / DBD en phase inverse.

Les contrôles sont obtenus en incubant de la cocaïne avec ou sans éthanol, sans enzyme.

Les valeurs représentent les moyennes \pm ESM (trois réplicats). *Significativement différent d'un échantillon sans éthanol par le test de Mann-Whitney ($p < 0.05$).

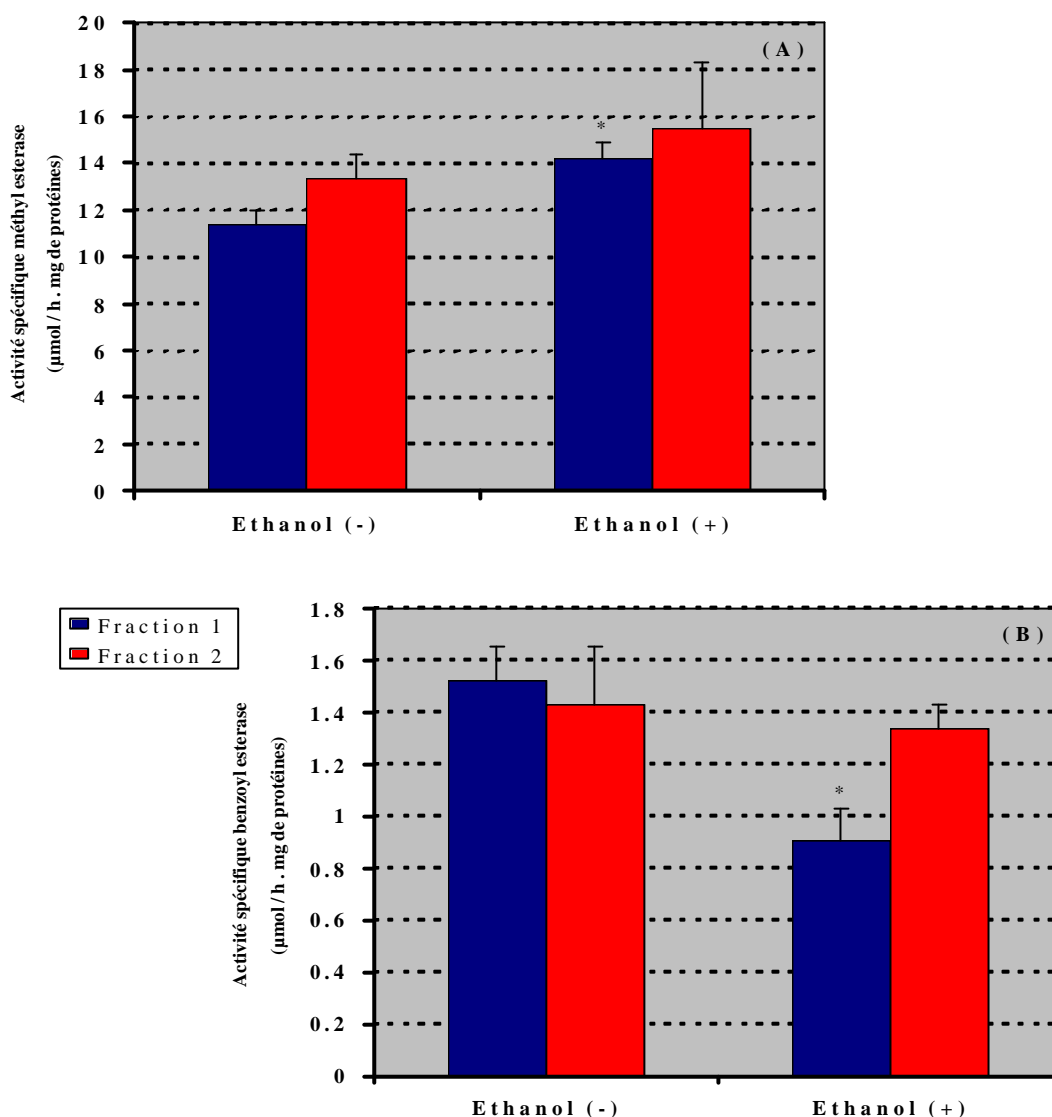


Figure 30. Effets de l'éthanol sur les activités cocaïne méthyl et benzoyl esterase en présence de carboxylesterases fortement purifiées (étape III).

La cocaïne (116 μM) est incubée pendant 60 minutes avec chacune des deux fractions enzymatiques séparées après filtration sur gel (1 μg de protéines), avec ou sans éthanol (40 mM). Les productions de benzoylecgonine (A) et d'acide benzoïque (quantification indirecte d'ecgonine méthyl ester ; B) sont analysées par CLHP / DBD en phase inverse.

Les contrôles sont obtenus en incubant de la cocaïne avec ou sans éthanol, sans enzyme.

Les valeurs représentent les moyennes \pm ESM (trois réplicats). *Significativement différent d'un échantillon sans éthanol par le test de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

La dégradation de cocaïne par les deux fractions enzymatiques obtenues du pool enzymatique 1 est globalement non affectée par l'éthanol (Figure 29). Cependant, les activités spécifiques esterase caractérisant la fraction enzymatique 1 sont sensibles à la présence d'éthanol de façon différente (Figure 30) : ainsi l'éthanol stimule de 20 % l'activité méthyl esterase (Figure 30A) et inhibe de 40 % l'activité benzoyl esterase (Figure 30B). Par conséquent, le plus important effet de l'éthanol sur le rapport (activité spécifique méthyl esterase / activité spécifique benzoyl esterase) caractérise la fraction enzymatique 1 (16 *versus* 7,4 pour la fraction enzymatique 2), sans aucun changement pour l'hydrolyse globale de la cocaïne (Figure 29). La fraction enzymatique 2 est moins sensible aux effets de l'éthanol : l'activité benzoyl esterase n'est pas affectée tandis que l'activité méthyl esterase est augmentée de 14 %. Bien qu'aucune production de cocaéthylène n'a pu être détectée, des consommations d'éthanol, 4,6 % (fraction enzymatique 1) et 4,8 % (fraction enzymatique 2) *versus* contrôle, ont été constatées par analyse de l'espace de tête par CPG / DIF, sans être toutefois significatives.

II. DISCUSSION

Deux carboxylesterases hépatiques humaines, CEh-1 et CEh-2, ont été purifiées et partiellement caractérisées [Brzezinski, 1994. Pindel, 1997]. Ces enzymes présentent différentes spécificités pour la cocaïne : CEh-1 hydrolyse le groupe méthyl ester produisant la benzoylecgonine tandis que CEh-2 rompt le groupe benzoyl ester pour former l'ecgonine méthyl ester [Dean, 1991].

Nous supposons que plus de deux espèces moléculaires enzymatiques pouvaient métaboliser la cocaïne au niveau du foie humain. Aussi, dans cette présente étude, nous avons isolé des carboxylesterases à partir d'un homogénat hépatique humain traité avec un détergent (1 % Triton X-100). Nous avons mesuré les activités de ces enzymes en présence de cocaïne. De plus, les effets de l'éthanol sur ces activités enzymatiques ont aussi été considérés. Une méthode CLHP en phase inverse avec détection UV [Kim et Bornheim, 1997] a été utilisée pour les déterminations simultanées de cocaïne, cocaéthylène, benzoylecgonine et acide

benzoïque (comme mesure indirecte de la formation d'ecgonine méthyl ester) produits *in vitro*, soit par un surnageant de foie humain, soit par des carboxylesterases hépatiques partiellement (étape I) ou fortement purifiées (étape III). Parce que l'ecgonine méthyl ester peut être hydrolysée en ecgonine, nous estimons que la quantification d'acide benzoïque apporte une mesure plus précise de la concentration de cocaïne hydrolysée au niveau du groupe benzoyl ester. Bien que l'acide benzoïque puisse aussi être produit par hydrolyse du groupe benzoyl ester de la benzoylecgonine, les résultats précédents ont montré que ce métabolite était un médiocre substrat pour les esterase des microsomes hépatiques de souris [Kim et Bornheim, 1997].

Nos expérimentations conduites avec un spécimen de foie humain confirment les précédentes observations. L'addition d'éthanol à un homogénat de foie ou à des carboxylesterases partiellement ou fortement purifiées indique une inhibition partielle des processus de détoxification de la cocaïne. Nous constatons en effet une diminution de la concentration de benzoylecgonine produite et aucune modification apparente de la production d'ecgonine méthyl ester. Cet effet de l'alcool sur le métabolisme de la cocaïne pourrait expliquer la production de cocaéthylène en dépit de l'absence de détection de ce composé sous nos conditions expérimentales *in vitro*. Cette absence de détection pourrait s'expliquer soit par un court temps d'incubation (60 minutes), soit par une production de cocaéthylène à des concentrations qui se situent en dessous de la limite de détection. Une hydrolyse du cocaéthylène formé pourrait aussi prévenir la détection de la cocaïne éthyl transferase.

L'étape I de la procédure de purification effectuée avec un système de micropurification (SMART System[®]) sur une colonne Mono Q HR 5 / 5 échangeuse d'anions a permis d'isoler trois pools enzymatiques. L'activité hydrolytique totale (Figure 26) et les activités spécifiques méthyl et benzoyl esterase (Figure 27) sont simultanément présentes mais en proportions différentes. En présence d'éthanol, le pool enzymatique 3 entraîne la plus forte diminution dans le rapport de spécificité (activité spécifique méthyl esterase / activité spécifique benzoyl esterase) ; cette diminution peut être mise en relation avec une inhibition spécifique de l'activité méthyl esterase par l'éthanol. Selon la littérature [Dean, 1991. Brzezinski, 1994], la décroissance non significative de benzoylecgonine formée pourrait être considérée comme une mise en évidence indirecte de la production de cocaéthylène. Ceci pourrait donc suggérer que l'activité spécifique éthyl transferase serait contenue dans le pool enzymatique 3 malgré l'absence de cocaéthylène détectable sous nos conditions expérimentales.

La chromatographie d'affinité sur Concanavaline A Sépharose 4B utilisant une colonne Mono Q HR 5 / 5 ne permet pas la séparation de la cocaïne méthyl esterase de la cocaïne benzoyl esterase, quelque soit le pool enzymatique obtenu après chromatographie par échange d'anions. Ces résultats sont en accord avec des observations précédentes [Brzezinski, 1994. Brzezinski, 1997] indiquant que les cocaïne méthyl et benzoyl esterase de foie humain sont toutes des glycoprotéines.

Les deux fractions isolées à partir du pool enzymatique 1 et séparées selon leur poids moléculaires respectifs ne montrent pas une spécificité absolue pour l'un des deux groupes ester de la cocaïne, mais catalysent simultanément l'hydrolyse de la cocaïne en benzoylecgonine et ecgonine méthyl ester (Figure 30). L'addition d'éthanol altère le rapport de spécificité pour une fraction. Sous nos conditions expérimentales et pour la fraction enzymatique 1, l'éthanol entraîne environ 40 % d'inhibition de l'activité benzoyl esterase (Figure 30B) et une légère activation de l'activité méthyl esterase (Figure 30A). Sous les mêmes conditions mais concernant la fraction enzymatique 2, une inhibition et une activation modérées affectent les activités. Par conséquent, le rapport des activités liées aux deux voies de détoxification n'est pas affecté.

Les caractéristiques réactionnelles distinctes des pools enzymatiques 2 et 3 comparées au pool enzymatique 1 suggèrent fortement qu'ils peuvent être constitués de fractions différentes. Une poursuite de la purification serait donc souhaitable.

Ces résultats préliminaires *in vitro* montrent pour la première fois que plus de deux fractions des carboxylesterases seraient impliquées dans l'élimination de la cocaïne, produisant benzoylecgonine et ecgonine méthyl ester, deux métabolites toxicologiquement inactifs. De plus, il est montré que les sensibilités de ces fractions enzymatiques à l'éthanol sont variables. Ceci est intéressant sachant que les effets toxiques de l'éthanol [Jover, 1991] sont attribués au dysfonctionnement de l'une ou des deux voies de détoxification, avec une activation concomitante de la petite voie de métabolisation impliquant la N-déméthylation de la cocaïne en norcocaïne par le système du cytochrome P-450. Cette route est largement responsable de l'hépatotoxicité induite par la cocaïne [Kloss, 1984].

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

L'objectif de notre étude était d'étudier l'influence de l'éthanol sur le métabolisme hépatique de la cocaïne selon deux modèles :

- Un modèle cellulaire représenté par les hépatocytes de rat en suspension et,
- Un modèle acellulaire reconstitué à partir de carboxylesterases partiellement ou fortement purifiées de foie humain.

Le modèle cellulaire présente l'intérêt de contenir l'ensemble des voies du métabolisme de la cocaïne et de l'éthanol. Ces différentes voies interviendraient dans le processus de renforcement de la toxicité hépatique lié à la présence d'éthanol.

La technique d'extraction phase solide et la chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse ont été développées de façon à doser simultanément huit molécules dérivant de la cocaïne et du cocaéthylène, de polarités variables, à partir d'une suspension d'hépatocytes isolés de rat. En particulier, notre méthode permet d'identifier l'ecgonine dont l'analyse est très peu décrite dans la littérature. Nos résultats préliminaires indiquent que l'éthanol aux trois concentrations testées (20, 40 et 80 mM) n'a aucun effet sur la cinétique de métabolisation de la cocaïne. Notre étude confirme que l'addition d'éthanol à des cellules hépatiques de rat en suspension supplémentées en cocaïne résulte en la formation précoce de benzoylecgonine et de cocaéthylène. Ces résultats confortent un peu plus la thèse selon laquelle l'hydrolyse du groupe méthyl ester de la cocaïne et la réaction de transesterification sont médiées par la même carboxylesterase hépatique. L'apparition retardée d'ecgonine méthyl ester démontre l'activation d'une deuxième voie de détoxification. La production tardive d'ecgonine indique une dégradation de la benzoylecgonine et de l'ecgonine méthyl ester. De plus, la voie d'oxydation intervenant dans l'induction du stress oxydant en produisant de la norcocaïne est tardivement stimulée. Enfin, notre étude montre une métabolisation complète de la concentration initiale en éthanol.

Discussion générale et conclusion

La procédure de purification nous a permis de suspecter la présence d'autres isoformes que les carboxylesterases formes 1 et 2 de foie humain impliquées dans le métabolisme de la cocaïne et déjà isolées. A partir d'un modèle enzymatique reconstitué *in vitro*, nos résultats préliminaires indiquent que d'autres esterase que les formes 1 et 2 de foie humain seraient impliquées dans l'élimination de la cocaïne, produisant benzoylecgonine et ecgonine méthyl ester. De plus, nous avons montré que les sensibilités de ces enzymes à l'éthanol sont variables.

En conséquence, nos résultats diffèrent selon le modèle expérimental choisi et l'espèce testée. Sur hépatocytes isolés de rat, l'éthanol ne produit aucun effet sur la métabolisation *in situ* de la cocaïne. Au contraire, l'éthanol inhibe la métabolisation de la cocaïne sur un modèle acellulaire reconstitué *in vitro* à partir d'enzymes partiellement ou fortement purifiées de foie humain. De plus, si du cocaéthylène a pu être détecté sur hépatocytes, aucune trace n'a pu être mise en évidence au moyen de notre modèle acellulaire.

Seule l'activité spécifique méthyl esterase est inhibée en présence d'éthanol tant dans le modèle d'hépatocytes isolés de rat que dans le modèle acellulaire humain.

En conclusion, nos résultats confortent un peu plus le fait que le renforcement hépatotoxique de la cocaïne lié à la présence d'éthanol peut être attribué au dysfonctionnement de l'une ou des deux voies de métabolisation avec une activation concomitante de la voie mineure d'oxydation impliquant la N-déméthylation de la cocaïne en norcocaïne. De plus, du norcocaéthylène est potentiellement produit.

PERSPECTIVES

PERSPECTIVES

Notre travail ouvre différentes perspectives.

La transesterification d'autres substrats que la cocaïne en présence d'éthanol pourrait être étudiée sur hépatocytes isolés de rat. Par exemple, la transformation de la norcocaïne en norcocaéthylène et de l'ecgonine méthyl ester en ecgonine éthyl ester.

Les différentes carboxylesterases mises en évidence pourraient être purifiées jusqu'à homogénéité. L'effet de l'éthanol sur l'activité enzymatique pourrait être approfondi.

De plus, il serait intéressant d'étudier plus particulièrement la voie oxydative conduisant au norcocaéthylène, précurseur d'entités radicalaires dont le norcocaéthylène nitroxyde et d'espèces réactives de l'oxygène.

Pour finir, compte-tenu du rôle des systèmes de défense antioxydants vis-à-vis d'un stress induit par une consommation de cocaïne, nous souhaitons également étudier l'influence d'un co-abus d'éthanol sur ces derniers au niveau du foie.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

ASPERG A. and TOTTMAR O. Oxidative stress decrease antioxidant enzyme activities in reaggregating cultures of rat brain cells. *Free Rad Biol Med* 17 : 511-516, 1994.

BANSAL M., GARG P. and SINGHAL P.C. Morphine, alcohol and cocaine modulates mesangial mitochondrial pattern. *Res Commun Alcohol Subst Abuse* 15 : 131-139, 1994.

BERRY M.N. and FRIEND D.S. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. A biochemical and fine structural study. *J Cell Biol* 43 : 506-520, 1969.

(a)BOELSTERLI U.A., ATANOSKI S. and GOLDLIN C. Ethanol-induced enhancement of cocaine bioactivation and irreversible protein binding : evidence against a role of cytochrome P-450 IIE1. *Alcohol Clin Exp Res* 15 : 779-784, 1991.

(b)BOELSTERLI U.A. and GOLDLIN C. Biomechanisms of cocaine-induced hepatocyte injury mediated by the formation of reactive metabolites. *Arch Toxicol* 65 : 351-360, 1991.

BOELSTERLI U.A., LANZOTTI A., GOLDLIN C.R. and OERTLE M. Identification of cytochrome P450 IIB1 as a cocaine-bioactivating isoform in rat hepatic microsomes and in cultured rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 20 : 96-101, 1992.

BOELSTERLI U.A., WOLF A. and GOLDLIN C.R. Oxygen free radical mediated hepatotoxicity by cocaine and cocaine and ethanol derived metabolite, cocaethylene, in rat hepatocytes. *Hepatology* 18 : 1154-1161, 1993.

BONATE P.L., DAVIS C.M., SILVERMAN P.B. and SWANN A. Determination of cocaine in biological matrix using reversed phase HPLC : application to plasma and brain tissues. *J Liq Chromatog* 18 : 3473-3494, 1995.

BOUIS D. and BOELSTERLI U.A. Modulation of cocaine metabolism in primary rat hepatocytes cultures : effect of irreversible binding and protein biosynthesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 102 : 429-439, 1990.

BOYER C.S. and PETERSEN D.R. Potentiation of cocaine-mediated hepatotoxicity by acute and chronic alcohol. *Alcohol Clin Exp Res* 14 : 28-31, 1990.

BOYER C.S. and PETERSEN D.R. Hepatic biochemical changes as a result of acute cocaine administration in the mouse. *Hepatology* 14 : 1209-1216, 1991.

BOYER C.S., SHIRLEY J.J. and PETERSEN D.R. Effect of cocaine and its oxidative N-demethylation products on isolated mouse mitochondrial respiration (Abstract). *Hepatology* 8 : 1235A, 1988.

BRANNAN T.S., MAKEN H.S. and RAES I.P. Regional distribution of catalase in adult rat brain. *J Neurochem* 36 : 307-309, 1981.

BRIDGES J.W., BENFORT D.U. et HUBBARD S.A. Mechanisms of toxic injury. *Ann N.Y. Acad Sci* 407 : 42-63, 1983.

BRODY S.L., SLOVIS C.M. and WRENN K.D. Cocaine-related medical problems : consecutive series of 233 patients. *Am J Med* 88 : 325-331, 1990.

BRZEZINSKI M.R., ABRAHAM T.L., STONE C.L., DEAN R.A. and BOSRON W.F. Purification and characterization of a human liver cocaine carboxylesterase that catalyzes the production of benzoylecgonine and the formation of cocaethylene from alcohol and cocaine. *Biochem Pharmacol* 48 : 1747-1755, 1994.

BRZEZINSKI M.R., SPINK B.J., DEAN R.A., BERKMAN C.E., CASHMAN J.R. and BOSRON W.F. Human liver carboxylesterase hCE-1 : binding specificity for cocaine, heroin, and their metabolites and analogs. *Drug Metab Dispos* 25 : 1089-1096, 1997.

BURCHELL B., COUGHTRIE M.W.H. UDP-glucuronosyltransferases. *Pharmacol Ther* 43 : 261-289, 1989.

CALLANS D.J., WECHER L. and MITCHELL M.C. Effect of ethanol feeding and withdrawal on plasma glutathione elimination in rat. *Hepatology* 7 : 496-501, 1987.

CAUSON R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion. *J of Chromatography B* 689 : 175-180, 1997.

CHOW M.J., AMBRE J.J., RUO T.I., ARKINSON A.J., BROWSHER D.J. and FISHMAN M.W. Kinetics of cocaine distribution, elimination, and chronotropic effects. *Clin Pharmacol Ther* 38 : 318-324, 1986.

CHURCH M.W., HOLMES P.A., OVERBECK G.W. TILAK J.P. and ZAJAC C.S. Interactive effects of prenatal alcohol and cocaine exposures on postnatal mortality, development and behavior in the Long-Evans rat. *Neurotoxicol Teratol* 13 : 377-386, 1991.

CONE E.J., OYLER J. and DARWIN W.D. Cocaine disposition in saliva following intravenous, intranasal and smoked administration. *J Anal Toxicol* 21 : 465-475, 1997.

CORONA G.L., SANTAGOSTINO G., FACINO R.M. and PIRILLO D. Cell membrane modifications in rabbit isolated hepatocytes following a chronic amitryptiline treatment. *Biochem Pharmacol* 22 : 849-856, 1973.

CROUCH D.J., ALBURGER M.E., SPANBAUER A.C., ROLLINS D.E., MOODY D.E. and CHASIN A.A. Analysis of cocaine and its metabolites from biological specimens using solid-phase extraction and positive ion chemical ionization mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 19 : 352-358, 1995.

DEAN R.A., CHRISTIAN C.D., SAMPLE R.H.B. and BOSRON W.F. Human liver cocaine esterases : ethanol-mediated formation of ethylcocaine. *FASEB J* 5 : 2735-2739, 1991.

DEAN R.A., HARPER E.T., DUMAUAL N., STOECKEL D.A. and BOSRON W.F. Effects of ethanol on cocaine metabolism : formation of cocaethylene and norcocaethylene. *Toxicol Appl Pharmacol* 117 : 1-8, 1993.

DE HAAN J.B., NEWMAN J.D. and KOLA I. Cu / Zn superoxide dismutase mRNA and enzyme activity and susceptibility to lipid peroxidation increases with aging in murine brains. *Mol Brain Res* 13 : 179-187, 1992.

DEVI B.G. and CHAN A.W.K. Cocaine-induced peroxidative stress in rat liver : antioxidant enzymes and mitochondria. *J Pharmacol Exp Ther* 279 : 359-366, 1996.

EICHHORN E.J., DEMAINE S.E., ALVAREZ L.G., WILLARD J.E., MOLINA S., BARTULA L.L., PRINCE M.D., INMAN L.R., GRAYBURN P.A. and MEYERS S.I. Cocaine induced alterations in prostaglandin production in rabbit aorta. *J Am Coll Cardiol* 19 : 696-703, 1992.

EVANS M.A. and HARBISON R.D. Cocaine-induced hepatic necrosis in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 45 : 739-754, 1978.

EVANS M.A. The role of protein binding in cocaine-induced hepatic necrosis. *J Pharmacol Exp Ther* 224 : 73-79, 1983.

FACY F. Toxicomanes incarcérés : étude épidémiologique auprès des antennes 1992-1995. Paris : EDK, 107 pages, 1997.

FARISS M.W., OLAFSDOTTIR K. and REED D.J. Extracellular calcium protects isolated rat hepatocytes from injury. *Biochem Biophys Res Commun* 121 : 102-110, 1984.

FARRE M., LLORENTE M., UGENA B., LAMAS X. and CAMI J. Interaction of cocaine with ethanol : a pilot study in humans. In abstracts, Committee on problems of Drug Dependence, 1990.

FARRE M., DE LA TORRE R., LLORENTE M., LAMAS X., UGENA B., SEGURA J. and CAMI J. Alcohol and cocaine interactions in humans. *J Pharmacol Exp Ther* 266 : 1364-1373, 1993.

FARRE M., TORRE R., GONZALEZ M.L., TERAN M., ROSET P.N., MENOYO E. and CAMI J. Cocaine and alcohol interactions in humans : neuroendocrine effects and cocaethylene metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* 283 : 164-176, 1997.

FERNANDEZ P., LAFUENTE N., BERMEJO A.M., LOPEZ-RIVADULLA M. and CRUZ A. HPLC determination of cocaine and benzoylecgonine in plasma and urine from drug abusers. *J Anal Toxicol* 20 : 224-228, 1996.

FIGLIOMENI M.L. and ABDEL-RAHMAN M.S. Role of ethanol exposure on cocaine metabolism in rat hepatocytes. Impaired uptake of glutathione by mitochondria from chronic ethanol fed rats : Tracer kinetic studies *in vitro* and *in vivo* and susceptibility to oxidative stress. *J Appl Toxicol* 17 : 105-112, 1997.

FOLTIN R.W. and FISCHMAN M.W. Ethanol and cocaine interactions in human : cardiovascular consequences. *Pharmacol Biochem Behav* 31 : 877-883, 1988.

FOLTIN R.W. and FISCHMAN M.W. Ethanol and cocaine interactions in humans : cardiovascular consequences. *Pharmacol Biochem Behav* 15 : 7-74, 1989.

FOLTIN R.W., FISCHMAN M.W. and LEVIN F.R. Cardiovascular effects of cocaine in humans : laboratory studies. *Drug Alcohol Depend* 37 : 193-210, 1995.

FREEMAN R.W. and HARBISON R.D. Hepatic periportal necrosis induced by chronic administration of cocaine. *Biochem Pharmacol* 30 : 773-783, 1981.

FRIEDL H.P., TILL G.O., RYAN U.S. and WARD P.A. Mediator-induced activation of xanthine oxidase in endothelial cells. *Fed Am Soc Exp Biol J* 3: 2512-2518, 1989.

FRY J.R. et BRIDGES J.W. Use of primary hepatocyte cultures in biochemical toxicology. *Rev Biochem Toxicol* 1: 201-247, 1979.

FUJII Y., JOHNSON M.E. and GORES G.J. Mitochondrial dysfunction during anoxia / reoxygenation injury of liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology* 20: 177-185, 1994.

GAELOTTI T., EBOLI M.L., PALOMBINI G., VAN ROSSUM G.D.V. and KAPOOR S.C. Inhibition of mitochondrial oxidative metabolism by SKF-525A in intact cells and isolated mitochondria. *Biochem Pharmacol* 32: 3285-3293, 1983.

GAILLARD Y., PEPIN G., MARQUET P., KINTZ P., DEVEAUX M. and MURA P. Identification et dosage de la benzoylecgonine, cocaïne, méthylecgonine-ester, codéine, morphine et 6-acétylmorphine dans la sang total. *Toxicorama* 8: 17-22, 1997.

GARCIA-RUIZ C., MORALES A., BELLESTA A., RODES J., KAPLOWITZ N. and FERNENDEZ-CHECA J.C. Effect of chronic ethanol feeding on glutathione and functional integrity of mitochondria in periportal and perivenous hepatocytes. *J Clin Invest* 94: 193-201, 1994.

GARHART C.A., ANWER M.S. and SHUSTER L. Cocaine-induced changes in perfusion pressure and bile flow in perfused rats. *Biochem Pharmacol* 38: 2739-2745, 1989.

GATES G.A., HENLEY K.S., POLLARD H.M., SCHMIDT E. and al. The cell population of human liver. *J Lab Clin Med* 57: 182-184, 1961.

GATLEY S.J. Activities of the enantiomers of cocaine and some related compounds as substrates and inhibitors of plasma butyrylcholinesterase. *Biochem Pharmacol* 41: 1249-1254, 1991.

GEBHARDT R. Metabolic zonation of the liver : regulation and implication for liver function. *Pharmacol Ther* 53 : 275-354, 1992.

GOLDLIN C.R. and BOELSTERLI U.A. Reactive oxygen species and non peroxidative mechanisms of cocaine-induced hepatotoxicity in rat hepatocytes culture. *Toxicology* 69 : 79-91, 1991.

GONZALEZ F.J. Human cytochromes P-450 : problems and prospects. *TIPS* 13 : 346-352, 1992.

GOTTAFFRIED M.R., KLOSS M.W., GRAHAM D., RAUCKMAN E.J. and ROSEN G.M. Ultrastructure of experimental cocaine hepatotoxicity. *Hepatology* 6 : 299-304, 1986.

GRANT B.F. and HARFORD T.C. Concurrent and simultaneous use of alcohol with cocaine: results of national survey. *Drug and alcohol Dependence* 25 : 97-104, 1990.

GRANT R.L. and ACOSTA D. Jr. A digitized fluorescence imaging study on the effect of local anesthetic on cytosolic calcium and mitochondrial membrane potential in cultured rabbit corneal epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 129 : 23-35, 1994.

GRISHAM J.W. Use of hepatic cell cultures to detect and evaluate the mechanisms of action of toxic chemicals. *Int Rev Exp Pathol*, 1979.

GROEN A.K. and al. Intracellular compartmentation and control of alanine metabolism in rat liver parenchymal cells. *Eur J Biochem* 122 : 87-93, 1982.

(a)GRUNDIN R. Metabolic interaction of ethanol and alprenolol in isolated liver cells. *Acta Pharmacol Toxicol* 37 : 185-200, 1975.

(b)GRUNDIN R., MOLDEUS P., VADI H., ORRENIUS S., VON BARH C., BACKSTROM D. et EHRENBURG A. Drug metabolism in isolated rat liver cells. *Adv Exp Med Biol* 58 : 251-269, 1975.

HARRIS E.D. Regulation of antioxidant enzymes. *Fed Am Soc Exp Biol J* 6 : 2675-2683, 1992.

(a)HEARN W.L., FLYNN D.D., HIME G.W., ROSE S., COFINO J.C., MANTERO-ATIENZA E., WETLI C.V. and MASH D.C. Cocaethylene : a unique cocaine metabolite displays high affinity for the dopamine transporter. *J Neurochem* 56 : 698-701, 1991.

(b)HEARN W.L., ROSE S., WAGNER J., CIARLEGLIO A. and MASH D.C. Cocaethylene is more potent than cocaine in mediating lethality. *Pharmacol Biochem Behav* 39 : 531-533, 1991.

HEDAYA M.A. and PAN W.J. Cocaine and alcohol interactions in naive and alcohol-pretreated rats. *Drug Metab Dispos* 24 : 807-812, 1996.

(a)HEDAYA M.A. and PAN W.J. Effect of alcohol coadministration on cocaine plasma and brain concentrations in the rat. *Drug Metab Dispos* 25 : 647-650, 1997.

(b)HEDAYA M.A. and PAN W.J. Cocaine pharmacokinetics / pharmacodynamics in awake freely moving rats. *Pharm Res* 14 : 1099-1102, 1997.

HIGGINS S.T., RUSH C.R., BICKEL W.K., HUGHES J.R., LYNN M. and CAPELESS M.A. Acute behavioral and cardiac effects of cocaine and alcohol combinations in humans. *Psychopharmacology (Berlin)* 111 : 285-294, 1993.

HIGGINS S.T., ROLL J.M. and BICKEL W.K. Alcohol pretreatment increases preference for cocaine over monetary reinforcement. *Psychopharmacology (Berlin)* 123 : 1-8, 1996.

HURD Y.L., KEHR J. and UNGERSTEDT U. *In vivo* microdialysis as a technique to monitor drug transport : correlation of extracellular cocaine levels and dopamine overflow in the rat brain. *J Neurochem* 51 : 1314-1316, 1988.

JATLOW P.L. Cocaine : analysis, pharmacokinetics and metabolic disposition *Yale J Bio Med* 61 : 105-113, 1987.

JATLOW P., ELSWORTH J.D., BRADBERRY C.W., WINGER G., TAYLOR J.R., RUSSELL R. and ROTH R.H. Cocaethylene : a neuropharmacologically active metabolite associated with concurrent cocaine-ethanol ingestion. *Life Sci* 48 : 1787-1794, 1991.

JOHANSON C.E. and FISCHMAN M.W. The pharmacology of cocaine related its abuse. *Pharmacol Rev* 41 : 3-52, 1989.

JOVER R., PONSODA X., GOMEZ-LECHON M.J., HERRERO C., DEL PINO J. and CASTELL J.V. Potentiation of cocaine hepatotoxicity by ethanol in human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 107 : 526-534, 1991.

JOVER R., PONSODA X., GOMEZ-LECHON J.M. and CASTELL J.V. Cocaine hepatotoxicity : two different toxicity mechanisms for phenobarbital-induced and non-induced rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 46 : 1967-1974, 1993.

KAMENDULIS L.M., BRZEZINSKI M.R., PINDEL E.V., BOSRON W.F. and DEAN R.A. Metabolism of cocaine and heroin is catalyzed by the same human liver carboxylesterases. *J Pharmacol Exp Ther* 279 : 713-717, 1996.

KATZ J.L., TERRY P. and WITKIN J.M. Comparative behavioral pharmacology and toxicology of cocaine and its ethanol-derived metabolite, cocaine ethyl-ester (cocaethylene). *Life Sci* 50 : 1351-1361, 1992.

KIERNAN F. The anatomy and physiology of the liver. *Phil Trans Roy Soc London B Biol Sci* 123 : 711-770, 1833.

KIM K.Y. and BORNHEIM L.M. Determination of esterase-catalyzed cocaine metabolite formation by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr Sci* 35 : 287-290, 1997.

Bibliographie

KINTZ P. and MANGIN P. Simultaneous determination of opiates, cocaine and major metabolites of cocaine in human hair by gaz chromatography / mass spectroscopy (GC / MS). *Forensic Sci Int* 73 : 93-100, 1995.

KLAASSEN C.D. et STACEY N.H. Use of isolated hepatocytes in toxicity assessment. *In* : Toxicology of the Liver, G Plaa, WR Hewitt (Eds) : Raven Press, New York. 147-179, 1982.

KLOSS M.W., ROSEN G.M. and RAUCKMAN E.J. Acute cocaine-induced hepatotoxicity in DBA / 2Ha male mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 65 : 75-83, 1982.

(a)KLOSS M.W., ROSEN G.M. and RAUCKMAN J.J. Evidence for enhanced *in vitro* lipid peroxidation after acute cocaine injection. *Toxicol Lett* 15 : 65-70, 1983.

(b)KLOSS M.W., ROSEN G.M. and RAUCKMAN E.J. N-demethylation of cocaine to norcocaine : evidence for participation by cytochrome P-450 and FAD containing monooxygenase. *Mol Pharmacol* 23 : 482-485, 1983.

KLOSS M.W., ROSEN G.M. and RAUCKMAN E.J. Cocaine-mediated hepatotoxicity : a critical review. *Biochem Pharmacol* 33 : 169-173, 1984.

KREEK M.J. and STIMMEL B. Alcoholism and polydrug use. New York : Haworth Press, 1984.

KUMOR K., SCHERE M., THOMPSON L. et al. Lack of cardiovascular tolerance during intravenous cocaine infusions in human volunteers. *Life Sci* 42 : 2063-2071, 1988.

LAKE B.G. and PAINE A.J. The effect of hepatocyte culture conditions on cytochrome P-450 linked drug metabolizing enzymes. *Biochem Pharmacol* 31 : 2141-2144, 1982.

LANGE R.A., FLORES E.D., CIGARROA R.G. and HILLIS L.D. Cocaine-induced myocardial ischemia and infarction. *Cardiology* 7 : 74-79, 1990.

Bibliographie

LAUTERBERG B.H., DAVIES H. and MITCHELL J.R. Ethanol supresses hepatic glutathione synthesis in rat *in vitro*. *J Pharmacol Exp Ther* 31 : 2031-2037, 1982.

LEON-VELARDE F., HUCHIO L. and MONGE C.C. Effect of cocaine on oxygen consumption and mitochondrial respiration in normoxic and hypoxic mice. *Life Sci* 50 : 213-218, 1992.

LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. and RANDALL R.J. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* 193 : 265-275, 1951.

MALLAT A. and DHUMEAUX D. Cocaine and the liver. *J Hepatol* 12 : 275-278, 1991.

MARTENSSON J., LAI J.C.K. and MEISTER A. High affinity transport of glutathione is a part of multicomponent system essential for mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 : 7185-7189, 1990.

McCANCE-KATZ E.F., PRICE L.H., McDOUGLE C.J., KOSTEN T.R., BLACK J.E. and JALTOW P.I. Concurrent cocaine-ethanol ingestion in humans : pharmacology, physiology, behavior and the role of cocaethylene. *Psychopharmacology (Berlin)* 111 : 39-46, 1993.

Mc CANCE E.F., PRICE L.H., KOSTEN T.R. and JATLOW P.I. Cocaethylene : pharmacology, physiology and behavioral effects in humans. *J Pharmacol Exp Ther* 274 : 215-223, 1995.

MEHANNY S.Z. and ABDUL-RAHMAN M.S. Cocaine hepatotoxicity in mice. Histologic and enzymatic studies. *Toxicol Pathol* 19 : 24-29, 1991.

MEISTER A. and ANDERSON M.E. Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52 : 711-760, 1983.

MORIYA F. and HASHIMOTO Y. The effect of postmortem interval on the concentrations of cocaine and cocaethylene in blood and tissus : an experiment using rats. *J Forensic Sci* 41 : 129-133, 1996.

NELSON D.R., KAMATAKI T., WAXMAN D.J., GUENGERICH F.P. and al. The P-450 superfamily : update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes and nomenclature. *DNA* 12 : 1-51, 1991.

NICOLAYSEN L.C., PAN H.T. and JUSTICE J.B. Jr. Extracellular cocaine and dopamine concentrations are linearly related in rat striatum. *Brain Res* 456 : 317-323, 1988.

ODELEYE O.E., WATSON R.R., ESKELSON C.D. and EARNEST D. Enhancement of cocaine-induced hepatotoxicity by ethanol. *Drug Alcohol Depend* 31 : 253-263, 1993.

PAN W.J. and HEDAYA M.A. Cocaine and alcohol interactions in the rat : effect on cocaine pharmacokinetics and pharmacodynamics. *J Pharm Sci* 88 : 459-467, 1999.

PANSEN M., PELLINEN P., STENBACK F., JOVANEN R.O., RAVINO H. and PELKONEN O. The role of CYP enzymes in cocaine-induced liver damage. *Arch Toxicol* 69 : 287-290, 1995.

PELLINEN P., HONKAKOSHI P., STENBACK F., NIEMITZ M., ALHAVA E., PELKONEN O., LANG M.A. and PASANEN M. Cocaine N-demethylation and its metabolism-related hepatotoxicity can be prevented by P450 3A inhibitors. *Eur J Pharmacol* 270 : 35-43, 1994.

PEREZ-REYES M. and JEFFCOAT A.R. Ethanol / cocaine interaction : cocaine and cocaethylene plasma concentrations and their relationship to subjective and cardiovascular effects. *Life Sci* 51 : 553-563, 1992.

PERINO L.E., WARREN G.H. and LEVINE J. Cocaine-induced hepatotoxicity in humans. *Gastroenterology* 93 : 176-180, 1987.

PETERSON K.L., LOGAN B.K. and CHRISTIAN G.D. Detection of cocaine and its polar transformation products and metabolites in human urine. *Forensic Sci Int* 73 : 183-196, 1995.

PINDEL E.V., KEDISHVILI N.Y., ABRAHAM T.R., BRZEZINSKI M.R., ZHANG J., DEAN R.A. and BOSRON W.F. Purification and cloning of a broad substrate specificity human liver carboxylesterase that catalyzes the hydrolysis of cocaine and heroin. *J Biol Chem* 272: 14769-14775, 1997.

PIRESON L. and MITCHELL M.C. Increased hepatic efflux of glutathione after chronic ethanol feeding. *Biochem Pharmacol* 35: 1533-1537, 1986.

PONSODA X., JOVER R., CASTELL J.V. and GOMEZ-LECHON M.J. Potention of cocaine hepatotoxicity in human hepatocytes by ethanol. *Toxic, In vitro* 6: 155-158, 1992.

RAFLA F.K. and EPSTEIN R.L. Identification of cocaine and its metabolites in human urine in the presence of ethyl alcohol. *J Anal Toxicol* 3: 59-63, 1979.

RANDALL T. Cocaine, alcohol mix in body to form even longer lasting. More lethal drug. *J Am Med Ass* 26: 1043-1044, 1992.

RAPPAPORT A.M., BOROWY Z.Y., LONGHEED W.M. and LOTTO W.N. Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit. Role in hepatic physiology and pathology. *Anat Recl* 119: 11-33, 1954.

RAUCKMAN E.J. and ROSEN G.M. Free radical aspect of cocaine metabolism and toxicity. *In microsomes and drug oxidation and drug toxicity*, Vol. 4, ed. by R. Sato and R. Kato, pp. 453-462, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1982.

RITCHER C. Do mitochondrial DNA fragments promote cancer aging? *FEBS Lett* 241: 1-51, 1988.

RITZ M.C., LAMB R.J., GOLDBERG S.R. and KUHAR M.J. Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine. *Science* 237: 1219-1223, 1987.

(a)ROBERTS S.M., MUNSON J.W., JAMES R.C. and HARBISON R.D. An assay for cocaethylene and other cocaine metabolites in liver using High-performance liquid chromatography. *Analyt Biochem* 202 : 256-261, 1992.

(b)ROBERTS S.M., ROTH L., HARBISON R.D. and JAMES R.C. Cocaethylene hepatotoxicity in mice. *Biochem Pharmacol* 43 : 1989-1995, 1992.

ROBERTS S.M., HARBISON R.D. and JAMES R.C. Inhibition by ethanol of the metabolism of cocaine to benzoylecgonine and ecgonine methyl ester in mouse and human liver. *Drug Metab Dispos* 21 : 537-541, 1993.

ROSE S., HEARN W.L., HIME G.W., WETLI C.V., RUTTENBER A.J. and MASH D.C. Cocaine and cocaethylene concentrations in human post mortem cerebral cortex. *Neurosci Abstr* 16 : 6-14, 1990.

ROSEN G.M., KLOSS M.W. and RAUCKMAN E.J. Initiation of in vitro lipid peroxidation by N-hydroxy-norcocaine and norcocaine. *Mol Pharmacol* 22 : 383-396, 1982.

ROTH L., HARBISON R.D., JAMES R.C., TOBIN T. and ROBERTS S.M. Cocaine hepatotoxicity : Influence of hepatic enzymes inducing and inhibiting agents on the site of necrosis. *Hepatology* 15 : 934-940, 1992.

SARPAR R., FARAJ B.A., TARCAN Y.A., CHANDORA D.B. and LENTON J.D. Assessment of splanchnic blood flow in alcohol and drug abusers using radionuclide angiography. *J Subst Abuse* 5 : 293-303, 1993.

SCHINDLER C.W., TELLA S.R., ERZOUKI H.K. and GOLDBERG S.R. Pharmacological mechanisms in cocaine's cardiovascular effects. *Drug Alcohol Depend* 37 : 183-191, 1995.

SHIGENAGA M.K., HAGEN T.M. and AMES B.N. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 : 10771-10778, 1994.

SHUSTER L., QUIMBY F., BATES A. and THOMPSON M.L. Liver damage from cocaine in mice. *Life Sci* 20 : 1035-1042, 1977.

SILVA M.O., ROTH D., REDDY K.R., FERNANDEZ J.A., ALBORES-SAAVEDRA J. and SCHIFF E.R. Hepatic dysfunction accompanying acute cocaine intoxication. *J Hepatol* 12 : 312-315, 1991.

SIMCHEN G. Silylating agents, second edition. Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland, 199 pp, 1995.

SMART R.G. and ANGLIN L. Do we know the lethal dose of cocaine? *J Forensic Sci* 32 : 303-312, 1987.

SMIRNOW D. and LOGAN B.K. Analysis of ecgonine and other cocaine biotransformation products in postmortem whole blood by precipitation-extractive alkylation and GC / MS. *J Anal Toxicol* 20 : 463-467, 1996.

SMITH R.M. Ethyl esters of arylhydroxy- and arylhydroxymethoxycocaines in the urines of simultaneous cocaine and ethanol users. *J Anal Toxicol* 8 : 38-42, 1984.

SPEISKY H., MacDONALD A., GILES G., HECTRO O. and ISREAL Y. Increased loss and decreases hepatic glutathione synthesis after acute ethanol administration. *Biochem J* 225 : 565-572, 1985.

STEWART D., INABA T., LUCASSEN M. and KALOW M. Cocaine metabolism : cocaine and norcocaine hydrolysis by liver and serum esterases. *Clin Pharm Ther* 25 : 464-468, 1979.

SUAREZ K.A., BHOUNSLE P. and RICHARDSON D.L. Protective effect of N-acetylcysteine pretreatment against cocaine-induced hepatotoxicity and lipid peroxidation in mice. *Res Commun Subst Abuse* 7 : 7-18, 1986.

TAKESHI H., KAPLOWITZ N., KAMIMURA T., TSUKAMOTO H. and FERNENDEZ-CHECA J.C. Hepatic mitochondrial GSH depletion and progression of experimental alcoholic liver disease in rats. *Hepatology* 16 : 1423-1428, 1992.

TEAF C.M., FREEMAN R.W. and HARBISON R.D. Cocaine-induced hepatotoxicity : Lipid peroxidation as a possible mechanism. *Drug chem Toxicol* 7 : 383-396, 1984.

THOMPSON M.L., SHUSTER L. and SHAW K. Cocaine-induced hepatic necrosis in mice. The role of cocaine metabolism. *Biochem Pharmacol* 28 : 2389-2395, 1979.

THOMPSON M.L., SHUSTER L., CASEY E. and KANEL G.C. Sex and strain differences in response to cocaine. *Biochem Pharmacol* 33 : 1299-1307, 1984.

THURMAN R.G. and KAUFFMAN F.C. Factors regulating drug metabolism in intact hepatocytes. *Pharmacol Rev* 31 : 229-251, 1980.

USZENSKI R.T., GILLIS R.A., SCHAER G.L., ANALOUEI A.R. and KUHN F.E. Additive myocardial depressant effects of cocaine and ethanol. *Am Heart J* 124 : 1276-1283, 1992.

WANLESS I.R., DORE S., GOPINATH N., TAN J., CAMERON R., HEATHCOTE E.J., BLENDIS L.M. and LEVY G. Histopathology of cocaine hepatotoxicity. *Gastroenterology* 98 : 497-501, 1990.

WINECKER R.E., GOLDBERGER B.A., TEBBETT I., BEHNKE M., EYLERE F.D., CONLAN M., WOBIE K., KARLIX J. and BERTHOLF R.L. Detection of cocaine and its metabolites in amniotic fluid and umbilical cord tissues. *J Anal Toxicol* 21 : 97-104, 1997.

WOODWARD J.J., MANSBACH R., CARROLL F.I. and BALSTER R.L. Cocaethylene inhibits dopamine uptake and produces cocaine-like actions in drug discrimination studies. *Eur J Pharmacol* 197 : 235-236, 1991.

Bibliographie

WU A.H.B., ONIGBINDE T.A., JOHNSON K.G. and WIMBISH G.H. Alcohol-specific cocaine metabolites in serum and urine of hospitalized patients. *J Anal Toxicol* 16: 132-136, 1992.

ANNEXES

ANNEXE I

DOSAGE DES PROTEINES PAR LE «KIT BIO-RAD *DC* PROTEIN ASSAY» PROTOCOLE AVEC MICROPLAQUE

I. PRINCIPE

Le «Bio-Rad *DC* Protein Assay Kit II» est un dosage colorimétrique permettant de déterminer la concentration des protéines, après solubilisation par un détergent, selon la méthode de Lowry [*Lowry, 1951*].

II. REACTIFS

II.1. REACTIF A

Réactif cupro-alcalin tartrique.

II.2. REACTIF B

Réactif de Folin dilué.

Les réactifs se conservent 6 mois à température ambiante, à l'abri de la lumière.

III. PROTOCOLE

La protéine de référence est la SAB (Sérum Albumine Bovine) (fraction V) fournie par Sigma.

III.1. PREPARATION D'UNE SOLUTION MERE DE SAB A 2 g/ L

10 mg de SAB + 5 ml de solution dans laquelle se trouvent les protéines.

Conserver à 4°C.

III.2. PREPARATION D'UNE GAMME ETALON DE SAB

1)

Préparer une gamme de concentrations de SAB (0 à 2 g / L) par dilution de la solution mère dans la solution dans laquelle se trouvent les protéines, selon le protocole ci-dessous.

Volume (µL) de SAB (2 g / L)	0	50	125	250	375	500	625	750	875	1000
Volume (µL) de solution	1000	950	875	750	625	500	375	250	125	0
Concentration finale (g / L) de SAB	0	0,1	0,25	0,5	0,75	1	1,25	1,5	1,75	2

2)

Sur une microplaque, procéder de la façon suivante :

-5 µL de standard.

-25 µL de réactif A ou A'⁽¹⁾.

⁽¹⁾ Utiliser le réactif A' (20 µL de réactif S + 1 mL de réactif A) si présence de détergent.

-200 µL de réactif B.

3)

Attendre 15 minutes à température ambiante.

III.3. DOSAGE DU SPECIMEN DE CONCENTRATION PROTEIQUE INCONNUE

-Diluer le spécimen de façon à ne pas sortir des valeurs de la gamme étalon.

-Remplacer 5 µL de standard par 5 µL de spécimen.

IV. LECTURE DE L'ABSORBANCE

Lire l'absorbance à 655 nm.

Les absorbances restent stables au moins 1 heure.

ANNEXE II

TEST DU MTT

I. PRINCIPE

La cytotoxicité du produit étudié est appréciée par la mesure de l'activité de la succinate deshydrogénase mitochondriale des cellules qui sont restées vivantes.

Cette enzyme transforme le MTT [bromure de 3 (4, 5-diméthylthiazol-2-yl)-2, 5-diphényltétrazolium] en cristaux bleus de formazan. Après dissolution de ces cristaux dans du DMSO (diméthylsulfoxyde), on effectue une lecture spectrophotométrique à 560 nm.

II. MATERIELS ET METHODES

II.1. REACTIF MTT

-200 mg de MTT + 40 mL de PBS (Phosphate Buffer Saline), soit une solution à 5 mg / mL.

-Filtrer la solution (diamètre de 0,2 µm).

II.2. PROTOCOLE

1)

Sur une plaque de "96 puits", procéder comme suit :

Témoins sans cellule et / ou sans toxique

-150 μ L d'eau distillée.

-30 μ L de la solution de MTT.

Echantillons

-150 μ L de la suspension d'hépatocytes (nombre défini de cellules).

-30 μ L de la solution de MTT.

2)

Placer 2 heures dans une étuve à 37°C.

3)

Centrifuger à 2000 rpm, à 20°C, pendant 10 min.

4)

Aspirer le surnageant (dépôt noir visible au fond de chaque puits).

5)

Déposer 150 μ L de DMSO dans chaque puits : coloration violette.

Attendre 2 min.

III. LECTURE

Faire une lecture spectrophotométrique à 560 nm sur le Multiskan MCC / 340 (Labsystems).

ANNEXE III

PUBLICATION 1

HUMAN LIVER CARBOXYLESTERASES: PURIFICATION OF THESE TWO ENZYMES, PROPERTIES IN RELATION TO COCAINE AND ALCOHOL METABOLISM, AND SPECIFICITIES

Karine BERTHOIN^{1, 2}, François WIDMER³, Christian GIROUD², Patrice MANGIN², Luc BARRET¹

¹*Laboratoire de Médecine Légale et Toxicologie, UFR de Médecine,
Grenoble, France*

²*Laboratoire de Toxicologie Analytique, Institut Universitaire de Médecine
Légale, Lausanne, Switzerland*

³*Laboratoire de Biologie et Physiologie Végétales, Lausanne, Switzerland*

ABSTRACT: The purpose of this work was: 1) investigation of cocaine metabolism in association with alcohol intake thoroughly. Carboxylesterases specificities with cocaine and cocaethylene metabolites were determined by incubating one of the two purified enzymes with benzoylecgonine, ecgonine methyl ester, ecgonine ethyl ester, norcocaine and norcocaethylene; 2) determination of each enzyme affinity for various xenobiotics. The first step consisted in isolating carboxylesterases 1 and 2 from human liver obtained by autopsy.

KEY WORDS: Cocaine; Ethanol; Cocaethylene; Carboxylesterases.

Problems of Forensic Sciences, vol. XLIII, 2000, 35–42

Received 9 September 1999; accepted 16 May 2000

INTRODUCTION

Abuse of cocaine in combination with alcohol is widespread [6]. If conjunction of alcohol with cocaine enhances euphoria and a sense of well-being, risks of morbidity and mortality increase [5].

In human, two liver carboxylesterases, designated hCE-1 and hCE-2, are implicated in metabolism of cocaine [1, 2, 8]. Carboxylesterase 1 catalyses hydrolysis of the methyl ester linkage of cocaine forming benzoylecgonine and methanol (Figure 1). Hydrolysis of the benzoyl ester group of cocaine to ecgonine methyl ester and benzoate is catalysed by human liver carboxylesterase 2 and serum cholinesterase [11]. Benzoylecgonine and ecgonine methyl ester are known to be toxicologically inactive metabolites. In the presence of ethanol, carboxylesterase type 1 also catalyses the ethyl trans-

esterification of cocaine to form cocaethylene plus methanol [1, 2]. Cocaethylene is equal to cocaine in production of hepatotoxicity in mice [10]. The oxidation of the N-methyl group of cocaine by the cytochrome P450 system is a minor pathway [9]. Nevertheless, norcocaine is the precursor of molecules more potently hepatotoxic than cocaine [4]. Hence, the duration and the magnitude of the wanted stimulant effects as well as the toxic effects of cocaine intake alone or simultaneously with alcohol depend on activity of these two enzymes.

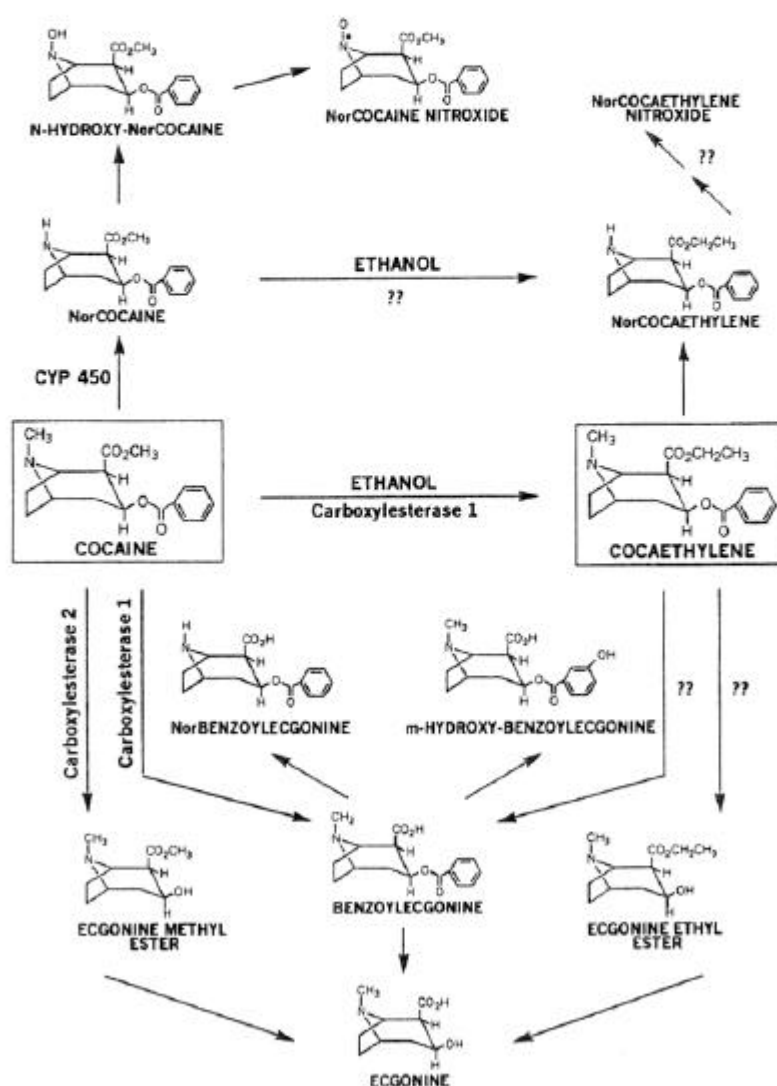


Fig. 1. Metabolic pathway of cocaine in association with alcohol. The metabolism of cocaine, cocaethylene and its metabolites involves at least three different classes of reaction: hydrolysis, transesterification and N-demethylation.

EXPERIMENTAL

Chemicals

Benzoyllecgonine and cocaethylene used as standards of reference (1 g/l) were obtained from CIL Cambridge Isotope Laboratories Inc. (Innerberg, Switzerland). Cocaine · HCl was obtained from Siegfried (Zofingen, Switzerland) and benzoic acid from Merck (Darmstadt, Germany). Cocaine · HCl and benzoic acid reference solutions (1 g/l) were prepared in methanol or acetonitrile. The internal standard lidocaine was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) and diluted in methanol to 2 g/l. Ethanol was obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

Benzamidine · HCl, PMSF, EDTA, DTT, glycerol and Triton X-100 were obtained from Sigma Chemie (Buchs, Switzerland). Mono Q HR 5/5 and Superdex 200 PC 3.2/30 columns and Concanavalin A Sepharose 4B were purchased from Pharmacia (Dübendorf, Switzerland). Centricon concentrator (30-kDa membrane) came from Millipore (Le Mont-sur-Lausanne, Switzerland).

All the reagents were of analytical grade.

Human tissue

One specimen of human liver was obtained by autopsy. The donor (male, 53-year-old) was not known as a drug or an ethanol abuser.

Homogenization of tissue

Frozen tissue was homogenized in a Waring Blender with Krebs-Henseleit-sodium bicarbonate pH 7.4 buffer containing 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM benzamidine, 1 mM PMSF, 1% Triton X-100 and 20% glycerol.

Centrifugation

Liver supernatant was prepared by ultracentrifugation at 150,000 g for 60 minutes at 4°C.

Purification procedure

The whole purification procedure was performed with a SMART System® from Pharmacia. This procedure required three steps: 1. Ion-exchange chromatography (Mono Q HR 5/5 column); 2. Affinity chromatography on Concanavalin A Sepharose 4B (Mono Q HR 5/5 column); 3. Gel filtration (Superdex 200 PC 3.2/30 column).

Liver supernatant was dialyzed against 20 mM Tris · HCl pH 7.4 containing 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM benzamidine and 1 mM PMSF

(Buffer A) and concentrated in a Centricon concentrator. The sample was loaded onto an ion-exchange column and bound proteins were eluted with a 20 ml linear gradient of Buffer A to Buffer A + 1 M NaCl.

Analytical techniques

Reverse phase-high performance liquid chromatography diode array detection

Analysis of cocaine, cocaethylene, benzoylecgonine and benzoic acid were carried out by HPLC-DAD. An isocratic mode was used for separation [CH₃CN: KH₂PO₄ 10 mM pH 3.0; 30: 70]. The column was a Merck LiChrospher® 60 RP-select B (25 cm long, 4 mm i.d. and 5 µm particle size) maintained at 40°C. The flow rate was 1.0 ml/ min and the detection was performed at 230 nm with a bandwidth of ± 10 nm.

Calibration curves were linear between 0 and 40 mg/l. The internal standard was lidocaine (100 mg/l).

Headspace GC/FID

Methanol and ethanol were analysed by Headspace GC-FID. Dioxane (1%) was used as internal standard.

Activities determinations

Enzymatic activity

Cocaine methyl and benzoyl esterase activities

Quantitations of benzoylecgonine and benzoic acid (indirect quantitation of ecgonine methyl ester) were used to determine methyl and benzoyl esterase activities, respectively. Supernatant or the active fractions obtained after one of the three purification steps were combined with 116 µM cocaine in Krebs-Henseleit-sodium bicarbonate pH 7.4 buffer (500 µl total volume) and incubated for 60 minutes at 37°C. Assays were quenched with an equal volume of 5% TCA. Precipitated proteins were removed by centrifugation. All supernatants were brought to pH 6.0 by 1 N and 5 N NaOH; the internal standard was added (12.5 µl of lidocaine).

Cocaine ethyl transferase activity

The appearance of cocaethylene was used to measure ethyl transferase activity. The procedure was as described above. The enzymatic reaction was started by addition of 40 mM ethanol.

Protein concentrations were determined with the Bio-Rad protein assay using bovine serum albumin as a standard.

Specific activities were expressed as nanomoles of product formed per hour per milligram of protein.

Chemical activity

Spontaneous hydrolysis of cocaine into benzoylecgonine in aqueous solution at physiological pH was determined by incubation without enzyme.

RESULTS

Based on previous kinetic results, carboxylesterases activities were measured by incubating the liver supernatant (500 µg protein) or the purified esterase (10 µg protein) for one hour, with cocaine alone (116 µM) or in presence of ethanol (40 mM). The cocaine methyl esterase, benzoyl esterase and ethyl transferase activities were determined by measuring the enzymatic hydrolysis (total minus spontaneous) of cocaine to benzoylecgonine, to ecgonine methyl ester and to cocaethylene respectively. While spontaneous hydrolysis occurs *in vitro* in aqueous solution at neutral to alkaline pHs, this pathway is not prevalent.

The carboxylesterase that catalyses the hydrolysis of cocaine to benzoylecgonine and methanol was partially purified from the 150,000 g human liver supernatant using ion-exchange chromatography (Table I). Cocaine methyl esterase was purified 44-fold (Table II).

Under *in vitro* conditions, the presence of cocaine ethyl transferase activity in liver supernatant and after the first step of purification, as well as the absence of methyl esterase activity, suggest that alcohol inhibits benzoylecgonine formation. Moreover, ethanol seems to activate cocaine hydrolysis (specific activity is 4-fold greater than in the absence of ethanol). The production of cocaethylene and the absence of benzoylecgonine suggest that these two separates activities are catalysed by the same enzyme, which is in agreement with the literature [1, 2].

DISCUSSION AND CONCLUSION

These preliminary results confirm that, in human liver and under *in vitro* conditions, the formation of cocaethylene via a cocaine ethyl transferase is alcohol-dependent. Rat liver exhibits cocaine ethyl transferase activity 33-fold greater than that in lung and 600-fold greater than that in kidney and heart [3]. No ethyl transferase activity was identified in brain, spleen or serum. Hence, formation and accumulation of cocaethylene in human liver

TABLE I. TOTAL AND SPECIFIC COCAINE METHYL AND BENZOYL ESTERASE ACTIVITIES

Purification steps ^(a)	Total protein [mg]	Cocaine ^(b)		Benzoyllecgonine ^(b)		Ecgonine methyl ester ^(b)	
		Total activity [nmol/h]	Specific activity [nmol/h/mg]	Total activity [nmol/h]	Specific activity [nmol/h/mg]	Total activity [nmol/h]	Specific activity [nmol/h/mg]
Supernatant of liver extract	30.60	462.2	15.10	295.0	9.641	167.2	5.464
Ion-exchange chromatography	0.151	88.29	584.7	64.52	427.3	—	—

^(a) Partial purification of the hCE-1 from 20 g of human liver.

^(b) Carboxylesterases activities with cocaine as substrate were measured as described under « Experimental ».

TABLE II. TOTAL AND SPECIFIC COCAINE ETHYL TRANSFERASE ACTIVITIES

Purification steps	Total protein [mg]	Cocaine ^(a)		Benzoyllecgonine ^(a)		Ecgonine methyl ester ^(a)		Cocaethylene ^(a)	
		Total activity nmol/h	Specific activity [nmol/h/mg]	Total activity [nmol/h]	Specific activity [nmol/h/mg]	Total activity [nmol/h]	Specific activity [nmol/h/mg]	Total activity [nmol/h]	Specific activity [nmol/h/mg]
Supernatant of liver extract	30.60	328.	10.72	—	—	64.32	2.102	(1)	(1)
Ion-exchange chromatography	0.151	0247.8	1641	—	—	—	—	184.2	1220

^(a) Carboxylesterases activities with cocaine and ethanol as substrates were measured as described under « Experimental ».

⁽¹⁾ Cocaethylene concentrations were below the detection limit of analytical technique by HPLC-DAD. Ethanol consumption was assessed by Headspace GC-FID. Total and specific activities were 317.0 $\mu\text{mol/h}$ and 10.36 $\mu\text{mol/h/mg}$, respectively.

is important in a toxicological point of view [7]. Ethyl cocaine could undergo N-demethylation to norcocaehtylene and produce cocaine like cytotoxicity (free radicals production) in the rat [3].

Moreover, in the presence of ethanol, the formation of benzoylecgonine from cocaine is inhibited while the synthesis of cocaethylene, a pharmacologically active metabolite, is stimulated [1, 2]. These in vitro effects are consistent with the effects of in vivo ethanol pretreatment of rats that decreases the AUCs for benzoylecgonine in all tissues and serum [3]. In the same study, cocaine methyl esterase activity was identified in kidney, liver, lung, heart and brain, decreasing in this order.

Abbreviations used: hCE-1, human carboxylesterase type 1; hCE-2, human carboxylesterase type 2; DTT, dithiothreitol; EDTA, ethylenediaminetetraacetate; PMSF, phenylmethylsulfonylfluoride; TCA, trichloroacetic acid.

References:

1. Brzezinski M. R., Abraham T. R., Stone C. L., Dean R. A., Bosron W. F., Purification and characterization of a human liver cocaine carboxylesterase that catalyzes the production of benzoylecgonine and the formation of cocaethylene from alcohol and cocaine, *Biochemical Pharmacology* 1994, vol. 48, pp. 1747–1755.
2. Dean R. A., Christian C. D., Sample R. H. B., Bosron W. F., Human liver cocaine esterases: ethanol-mediated formation of ethylcocaine, *FASEB Journal* 1991, vol. 5, pp. 2735–2739.
3. Dean R. A., Harper E. T., Dumaual N., Stoeckel D. A., Bosron W. F., Effects of ethanol on cocaine metabolism: formation of cocaethylene and norcocaehtylene, *Toxicology and Applied Pharmacology* 1992, vol. 117, pp. 1–8.
4. Evans M. A., Role of protein binding in cocaine-induced hepatic necrosis, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1983, vol. 224, pp. 73–79.
5. Farre M., De La Torre R., Llorente M., Lamas X., Ugena B., Segura J., Cami J., Alcohol and cocaine interactions in humans, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1993, vol. 266, pp. 1364–1373.
6. Grant B. F., Harford T. C., Concurrent and simultaneous use of alcohol with cocaine: results of national survey, *Drugs and Alcohol Dependence* 1990, vol. 25, pp. 97–104.
7. Jover R., Ponsoda X., Gomez-Lechon M. J., Herrero C., Del Pino J., Castell J. V., Potentiation of cocaine hepatotoxicity by ethanol in human hepatocytes, *Toxicology and Applied Pharmacology* 1991, vol. 107, pp. 526–534.
8. Kamendulis L. M., Brzezinski M. R., Pindel E. V., Bosron W. F., Dean R. A., Metabolism of cocaine and heroin is catalyzed by the same human liver carboxylesterases, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1996, vol. 279, pp. 713–717.

9. Kloss M. W., Rosen G. M., Rauckman E. J., N-demethylation of cocaine to norcocaine: evidence for participation by cytochrome P-450 and FAD containing monooxygenase, *Molecular Pharmacology* 1983, vol. 23, pp. 482–485.
10. Roberts S. M., Roth L., Harbison R. D., James R. C., Cocaethylene hepatotoxicity in mice, *Biochemical Pharmacology* 1992, vol. 43, pp. 1989–1995.
11. Stewart D. J., Inaba T., Tang B. K., Kalow W., Hydrolysis of cocaine in human plasma by cholinesterase, *Life Sciences* 1977, vol. 20, pp. 1557–1564.

ANNEXE IV

PUBLICATION 2

Abstract of Eurotox 2000, London.

Toxicology Letters, Vol. 116, 22.

Biotransformation

85

SEVERAL ISOFORMS OF HUMAN LIVER CARBOXYLESTERASES CAN METABOLISE COCAINE INTAKE SIMULTANEOUSLY WITH ALCOHOL: PRELIMINARY RESULTS

K. Berthoin^{1,2}, F. Widmer³, C. Giroud², P. Mangin², L. Barret¹. ¹Laboratory of Forensic Sciences and Toxicology, Faculty of Medicine, Grenoble, France; ²Laboratory of Analytical Toxicology, Academic Laboratory of Forensic Sciences, Lausanne, Switzerland; ³Laboratory of Plant Biology and Physiology, Biology Building, Lausanne, Switzerland

Abuse of cocaine in combination with ethanol is widespread. If this duality enhances euphoria and a sense of well-being, the risks of morbidity and mortality are increased in the same time.

In the present study, methyl- and benzoylesterase activities were determined *in vitro* using a $150,000 \times g$ supernatant from human liver. The effects of ethanol on the metabolism of cocaine were also examined. Addition of ethanol (40 mM) to an incubation mixture containing cocaine (116 μM) resulted in a 45% decrease of cocaine degradation and slightly diminished the rate of benzoylecgonine formation. Human hepatic methyl- and benzoylesterase activities were further characterised by micropurification (SMART System[®]). After purification by ion-exchange chromatography, three enzyme pools were isolated. Each of them exhibited a different ability to hydrolyse cocaine and presented both methyl- and benzoylesterase activities. Moreover, these different activities were modified when 40 mM ethanol was added. The enzyme pool eluted at low ionic strength was further purified by gel filtration. Elution resulted in two carboxylesterase activity peaks, whose respective abilities to produce benzoylecgonine and ecgonine methylester in the presence of ethanol were compatible with the presence of two isoforms.

Using a single specimen of human liver, these preliminary *in vitro* results showed for the first time that more than two isoforms of carboxylesterases were involved in cocaine elimination. Moreover, it appeared that the sensitivities of these isoforms to ethanol were different. With respect to the ability to hydrolyse simultaneously the two ester groups of cocaine, it was also shown that the specific cocaine methyl- and benzoylesterase activities were expressed by the same enzyme.